



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0026819
(43) 공개일자 2019년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/078 (2010.01) A61K 35/18 (2015.01)
G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0641 (2013.01)
A61K 35/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7003248
(22) 출원일자(국제) 2017년07월07일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2019년01월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/041155
(87) 국제공개번호 WO 2018/009838
국제공개일자 2018년01월11일

(30) 우선권주장
62/359,416 2016년07월07일 미국(US)

(71) 출원인
루비우스 테라퓨틱스, 아이엔씨.
미국, 02139 매사추세츠, 케임브리지, 스위트 1에이,
바사 스트리트 325

(72) 발명자
카베지안, 아마크
미국, 02421-5832 매사추세츠, 렉싱턴, 로커스트
애비뉴 52
마타-핀크, 조디
미국, 02144 매사추세츠, 서머빌, 8 윈저 로드 #
1
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 118 항

(54) 발명의 명칭 **외인성 RNA를 발현하는 치료용 세포 시스템과 관련된 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 단백질을 인코딩하는 외인성 RNA를 포함하는 적혈구 세포와 관련된 조성물 및 방법을 포함한다. 외인성 RNA는 조절 요소를 포함하는 이중성 비번역 영역을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 조합하여, 외인성 RNA는 화학적 변형을 포함할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 5/0644 (2013.01)

G01N 33/56966 (2013.01)

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2501/734 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

(72) 발명자

딘스, 로버트, 제이.

미국, 92506 캘리포니아, 리버사이드, 램즈게이트
코트 1609

하란디, 오미드

미국, 02459 매사추세츠, 뉴턴, 로웨나 로드 39

칸왈카, 어지이트

미국, 02139 매사추세츠, 케임브리지, 아파트 3,
엘름 스트리트 211

하리하란, 스네하

미국, 02472 매사추세츠, 알링턴, 아파트 407, 헤
밀턴 로드 18

명세서

청구범위

청구항 1

외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법으로서,

- a) 성숙 단계의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- b) 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA와 적혈구 세포를 접촉시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 적혈구 세포가 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 흡수하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 적혈구 세포 집단의 복수의 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 적혈구 세포의 집단의 복수의 세포가 각각 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 흡수하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA의 흡수 후, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 발현하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단이 3 내지 7일, 예를 들어, 4 내지 5일 또는 4 내지 6일 동안 성숙 배지에서 확장된 세포의 집단인 방법.

청구항 8

외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구의 집단을 제조하는 방법으로서,

- (e) 적혈구 전구 세포(예를 들어, CD34+ 세포)의 집단을 제공하는 단계;
- (f) 분화하는 적혈구 세포의 집단을 제공하는 분화 조건하에서 적혈구 전구 세포의 집단을 배양하는 단계;
- (g) 분화하는 적혈구 세포의 집단의 복수의 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA와 분화하는 적혈구 세포의 집단의 복수의 세포를 접촉시키는 단계; 및
- (h) 분화하는 적혈구 세포의 집단의 복수의 세포를 추가로 배양하여 망상적혈구 집단을 제공함으로써, 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구 집단을 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 추가 배양이 3, 2, 또는 1회 미만의 집단 배가를 포함하는 방법.

청구항 10

제3항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개 이상)을 포함하는 적혈

구 세포의 집단인 방법:

- i.a) 집단 내의 세포의 2 내지 40%, 3 내지 33%, 5 내지 30%, 10 내지 25%, 또는 15 내지 20%가 제핵되거나;
- i.b) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 2%, 3%, 4%, 또는 5% 미만이 제핵되거나;
- i.c) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 6%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만이 제핵되거나;
- i.d) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 미만이 제핵되거나;
- i.e) 집단 내의 세포의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하가 제핵되거나;
- i.f) 집단 내의 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 이하가 제핵되거나;
- i.g) 세포의 집단이 최대 제핵의 6 내지 70%, 10 내지 60%, 20 내지 50%, 또는 30 내지 40%에 도달하거나;
- i.h) 세포의 집단이 최대 제핵의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하에 도달하거나;
- i.i) 세포의 집단이 최대 제핵의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 60% 이하에 도달하거나;
- ii.a) 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토(plateau)로부터 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가하거나;
- ii.b) 세포의 집단이 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가할 수 있거나;
- ii.c) 집단이 집단 내의 세포의 적어도 70%의 제핵 수준에 도달하기 전에 집단이 1.5, 2, 또는 3배 이하만큼 증가하거나;
- iii.a) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- iii.b) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- iii.c) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- iii.d) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- iii.e) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- iii.f) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타낸다.

청구항 11

제10항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 ii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성, ii로부터의 특성,

및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 15

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 84 내지 99%, 85 내지 95%, 또는 약 90%가 GPA-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 16

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 적어도 84%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 GPA-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 17

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 54 내지 99%, 55 내지 98%, 60 내지 95%, 65 내지 90%, 70 내지 85%, 또는 75 내지 80%가 band3-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 18

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 적어도 54%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%가 band3-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 19

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 96 내지 100%, 97 내지 99%, 또는 약 98%가 alpha4 인테그린-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 20

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 alpha4 인테그린-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 21

제3항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키기 전 또는 후에, 복수의 세포가 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단으로부터 분리되고, 예를 들어, 복수의 세포가 제핵 상태를 기초로 하여 집단으로부터 분리되는(예를 들어, 복수의 세포는 유허 세포이고, 집단의 나머지는 제핵 세포임) 방법.

청구항 22

제3항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키기 전 또는 후에, 예를 들어, 집단과 제핵의 억제제(예를 들어, 히스톤 데아세틸라제(HDAC)의 억제제, 미토겐-활성화 단백질 키나제(MAPK)의 억제제, 사이클린-의존성 키나제(CDK)의 억제제, 또는 프로테아솜 억제제)를 인큐베이션 함으로써, 예를 들어, 집단의 성장, 발달, 헤모글로빈 합성, 또는 제핵 과정을 정지시킴으로써 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단을 동기화시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 정지가 집단 내의 세포의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10% 초과인 제핵 전에 발생하는 방

법.

청구항 24

외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구의 집단을 제조하는 방법으로서,

(i) 적혈구 전구 세포(예를 들어, CD34+ 세포)의 집단을 제공하는 단계;

(j) 분화하는 적혈구 세포의 집단을 제공하는 분화 조건하에서 적혈구 전구 세포의 집단을 배양하는 단계;

(k) 분화하는 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA와 분화하는 적혈구 세포를 접촉시키는 단계로서, 분화하는 적혈구 세포의 집단이 0.1 내지 25%가 제핵(예를 들어, 0.1 내지 20%가 제핵되거나, 0.1 내지 15%가 제핵되거나, 0.1 내지 12%가 제핵되거나, 0.1 내지 10%가 제핵)되는 경우에 접촉이 수행되는, 단계; 및

(l) 분화하는 적혈구 세포를 추가로 배양하여 망상적혈구 집단을 제공함으로써, 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구 집단을 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 추가 배양이 3, 2, 또는 1회 미만의 집단 배가를 포함하는 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 분화하는 적혈구 세포의 적어도 50%(적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 95%)가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내는 경우에 접촉이 수행되는 방법.

청구항 27

(a) 적혈구 전구 세포의 집단을 제공하는 단계, (b) 분화하는 적혈구 세포의 집단을 제공하는 분화 조건하에서 적혈구 전구 세포의 집단을 배양하는 단계, (c) 분화하는 적혈구 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계로서, 분화하는 적혈구 세포의 집단이 0.1 내지 25%가 제핵(예를 들어, 0.1 내지 20%가 제핵되거나, 0.1 내지 15%가 제핵되거나, 0.1 내지 12%가 제핵되거나, 0.1 내지 10%가 제핵)되는 경우에 접촉이 수행되는, 단계를 포함하는, 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구의 집단을 제조하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 분화하는 적혈구 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토 전에 3, 2, 또는 1회 미만의 집단 배가를 갖는 경우에 접촉이 수행되는 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 분화하는 적혈구 세포의 적어도 50%(적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 95%)가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내는 경우에 접촉이 수행되는 방법.

청구항 30

이종성 비번역 영역(UTR)에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포로서, 이종성 UTR이 조절 요소를 포함하는, 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포.

청구항 31

표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포.

청구항 32

적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 방법으로서,

a) 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포와 조절 요소를 포함하는 이종성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코

딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 접촉시키는 단계, 및

b) 외인성 mRNA의 흡수에 적합한 조건하에서 접촉된 적혈구 세포를 유지시킴으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 방법으로서,

a) 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포와 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 외인성 mRNA를 접촉시키는 단계; 및

b) 외인성 mRNA의 흡수에 적합한 조건하에서 접촉된 적혈구 세포를 유지시킴으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

제핵 적혈구 세포에서 외인성 단백질을 생성하는 방법으로서,

a) 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및

b) 외인성 단백질의 생성에 적합한 조건하에서 적혈구 세포를 배양함으로써 외인성 단백질을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

제핵 적혈구 세포에서 외인성 단백질을 생성하는 방법으로서,

a) 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및

b) 외인성 단백질의 생성에 적합한 조건하에서 적혈구 세포를 배양함으로써 외인성 단백질을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 대상체에 투여함으로써 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 단계를 포함하는,

대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 37

표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 대상체에 투여함으로써 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 단계를 포함하는,

대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 38

적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치(batch))를 평가하는 방법으로서,

- a) 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 제공하는 단계, 및
- b) 미리 선택된 파라미터에 대해 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가함으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 39

적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가하는 방법으로서,

- a) 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- b) 미리 선택된 파라미터에 대해 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가함으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 40

제30항에 있어서, 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 외인성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 41

제30항에 있어서, 집단 내의 세포가, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000 카피의 외인성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 42

제30항에 있어서, 세포가 mRNA와의 접촉 후 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일 동안 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000 카피의 외인성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 43

외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법으로서,

mRNA의 분해를 억제하는 조건, 예를 들어, 반응 혼합물 중에 리보뉴클레아제 억제제의 포함에 의한 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA 및 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및

적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 반응 혼합물을 유지시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 상기 집단과 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 집단의 복수의 적혈구 세포가 각각 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 흡수하는 방법.

청구항 46

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 발현하는 방법.

청구항 47

제43항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 48

제43항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 세포의 집단을 전기천공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 49

제43항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 적혈구 세포의 집단과 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 50

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 세포와 mRNA를 접촉시키기 전, 접촉시키는 동안, 또는 접촉시킨 후에 세포 집단과 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 51

제43항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙 단계 4, 5, 또는 6일에서 세포와 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 52

제43항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 성숙 단계의 세포인 방법.

청구항 53

제43항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개 이상)을 포함하는 경우에 세포와 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:

- i.a) 집단 내의 세포의 2 내지 40%, 3 내지 33%, 5 내지 30%, 10 내지 25%, 또는 15 내지 20%가 제핵되거나;
- i.b) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 2%, 3%, 4%, 또는 5% 미만이 제핵되거나;
- i.c) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 6%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만이 제핵되거나;
- i.d) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 미만이 제핵되거나;
- i.e) 집단 내의 세포의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하가 제핵되거나;
- i.f) 집단 내의 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 이하가 제핵되거나;
- i.g) 세포의 집단이 최대 제핵의 6 내지 70%, 10 내지 60%, 20 내지 50%, 또는 30 내지 40%에 도달하거나;
- i.h) 세포의 집단이 최대 제핵의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하에 도달하거나;
- i.i) 세포의 집단이 최대 제핵의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 60% 이하에 도달하거나;
- ii.a) 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토로부터 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가하거나;
- ii.b) 세포의 집단이 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가할 수 있거나;
- ii.c) 집단이 집단 내의 세포의 적어도 70%의 제핵 수준에 도달하기 전에 집단이 1.5, 2, 또는 3배 이하만큼 증가하거나;
- iii.a) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- iii.b) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- iii.c) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;

iii.d) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;

iii.e) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;

iii.f) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타낸다.

청구항 54

제53항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 ii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 55

제53항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 56

제53항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 57

제53항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성, ii로부터의 특성, 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 58

제43항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 이상)을 포함하는 경우(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의함)에 세포와 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:

집단 내의 세포의 84 내지 99%, 85 내지 95%, 또는 약 90%가 GPA-양성이거나;

집단 내의 세포의 적어도 84%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 GPA-양성이거나;

집단 내의 세포의 54 내지 99%, 55 내지 98%, 60 내지 95%, 65 내지 90%, 70 내지 85%, 또는 75 내지 80%가 band3-양성이거나;

집단 내의 세포의 적어도 54%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%가 band3-양성이거나;

집단 내의 세포의 96 내지 100%, 97 내지 99%, 또는 약 98%가 alpha4 인테그린-양성이거나;

집단 내의 세포의 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 alpha4 인테그린-양성이다.

청구항 59

제43항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 시험관 내 전사된 mRNA인 방법.

청구항 60

제43항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 집단의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 생존 가능한 방법.

청구항 61

제43항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 집단의 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%가 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 방법.

청구항 62

제43항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 세포의 비율이 리보뉴클레아제 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단에서 제핵되는 세포의 비율의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%인 방법.

청구항 63

제43항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 집단이 세포가 mRNA와 접촉시에 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 개의 세포를 포함하는 방법.

청구항 64

제43항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 집단이 세포가 mRNA와 접촉된 후 5일 이내에 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 확장되는 방법.

청구항 65

제43항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질을 발현하는 방법.

청구항 66

제43항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.

청구항 67

제43항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 집단이 리보뉴클레아제 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상, 또는 적어도 2배, 3배, 4배, 또는 5배 더 많은 외인성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 68

i) 적혈구 세포, ii) 외인성 단백질을 포함하는 mRNA 및 iii) 리보뉴클레아제 억제제를 포함하는 반응 혼합물.

청구항 69

제68항에 있어서, mRNA가 적혈구 세포 내에 있는 반응 혼합물.

청구항 70

제68항 또는 제69항에 있어서, 복수의 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물.

청구항 71

리보뉴클레아제 억제제에 대한 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 검정하는 방법으로서,

외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및

예를 들어, 반응 혼합물의 분취액에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, 또는 질량분광법에 의해 리보뉴클레아제 억제제의 존재 또는 수준을 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 리보뉴클레아제 억제제의 수준을 참조 값과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 비교에 반응하여,

집단을, 예를 들어, 필요조건을 충족하거나 필요조건을 충족하지 않는 것으로 분류하는 단계로서, 예를 들어, 리보뉴클레아제 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 필요조건이 충족되는 단계,

예를 들어, 리보뉴클레아제 억제제의 수준이 참조 값보다 위인 경우에 집단이 이후 정제 단계에 적합한 경우와 같이 집단을 이후의 처리 단계에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계,

집단을 치료제로 사용하기에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계, 또는

예를 들어, 리보뉴클레아제 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 집단 또는 이의 분취액을 치료제로 사용하기 위해 제형화하거나 패키징하는 단계 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 74

제43항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 리보뉴클레아제 억제제가 RNAsin Plus, Protector RNase Inhibitor, 또는 Ribonuclease Inhibitor Huma인 반응 혼합물 또는 방법.

청구항 75

외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법으로서,

단백질 분해를 억제하는 조건, 예를 들어, 반응 혼합물 중에 프로테아솜 억제제의 포함에 의한 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA 및 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및

적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 반응 혼합물을 유지시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 상기 집단과 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서, 집단의 복수의 적혈구 세포가 각각 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 흡수하는 방법.

청구항 78

제75항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 발현하는 방법.

청구항 79

제75항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 80

제75항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 세포의 집단을 전기천공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 81

제75항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 적혈구 세포의 집단과 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 82

제75항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 세포와 mRNA를 접촉시키기 전, 접촉시키는 동안, 또는 접촉시킨 후, 예를 들어, 세포와 mRNA를 접촉시키기 0.5 내지 2일 전 또는 0.5 내지 2일 후에 세포 집단과 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 83

제75항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 성숙 단계 4, 5, 또는 6일에서 세포와 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 84

제75항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 성숙 단계의 세포인 방법.

청구항 85

제75항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개 이상)을 포함하는 경우에 세포와 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:

- i.a) 집단 내의 세포의 2 내지 40%, 3 내지 33%, 5 내지 30%, 10 내지 25%, 또는 15 내지 20%가 제핵되거나;
- i.b) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 2%, 3%, 4%, 또는 5% 미만이 제핵되거나;
- i.c) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 6%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만이 제핵되거나;
- i.d) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 미만이 제핵되거나;
- i.e) 집단 내의 세포의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하가 제핵되거나;
- i.f) 집단 내의 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 이하가 제핵되거나;
- i.g) 세포의 집단이 최대 제핵의 6 내지 70%, 10 내지 60%, 20 내지 50%, 또는 30 내지 40%에 도달하거나;
- i.h) 세포의 집단이 최대 제핵의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하에 도달하거나;
- i.i) 세포의 집단이 최대 제핵의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 60% 이하에 도달하거나;
- ii.a) 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토로부터 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가하거나;
- ii.b) 세포의 집단이 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가할 수 있거나;
- ii.c) 집단이 집단 내의 세포의 적어도 70%의 제핵 수준에 도달하기 전에 집단이 1.5, 2, 또는 3배 이하만큼 증가하거나;
- iii.a) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- iii.b) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- iii.c) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- iii.d) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- iii.e) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- iii.f) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타낸다.

청구항 86

제85항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 ii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 87

제85항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 88

제85항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 89

제85항에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성, ii로부터의 특성, 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

청구항 90

제75항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 이상)을 포함하는 경우(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의함)에 세포와 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:

집단 내의 세포의 84 내지 99%, 85 내지 95%, 또는 약 90%가 GPA-양성이거나;

집단 내의 세포의 적어도 84%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 GPA-양성이거나;

집단 내의 세포의 54 내지 99%, 55 내지 98%, 60 내지 95%, 65 내지 90%, 70 내지 85%, 또는 75 내지 80%가 band3-양성이거나;

집단 내의 세포의 적어도 54%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%가 band3-양성이거나;

집단 내의 세포의 96 내지 100%, 97 내지 99%, 또는 약 98%가 alpha4 인테그린-양성이거나;

집단 내의 세포의 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 alpha4 인테그린-양성이다.

청구항 91

제75항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, mRNA가 시험관 내 전사된 mRNA인 방법.

청구항 92

제75항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 생존 가능한 방법.

청구항 93

제75항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 집단의 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%가 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 방법.

청구항 94

제75항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 세포의 비율이 프로테아솜 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단에서 제핵되는 세포의 비율의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%인 방법.

청구항 95

제75항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 집단이 세포가 mRNA와 접촉시에 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 개의 세포를 포함하는 방법.

청구항 96

제75항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 집단이 세포가 mRNA와 접촉된 후 5일 이내에 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 확장되는 방법.

청구항 97

제75항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질을 발현하는 방법.

청구항 98

제75항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.

청구항 99

제75항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 집단이 프로테아솜 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상, 또는 적어도 2배, 3배, 4배, 또는 5배 더 많은 외인성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 100

i) 적혈구 세포, ii) 외인성 단백질을 포함하는 mRNA 및 iii) 프로테아솜 억제제를 포함하는 반응 혼합물.

청구항 101

제100항에 있어서, mRNA가 적혈구 세포 내에 있는 반응 혼합물.

청구항 102

제100항 또는 제101항에 있어서, 복수의 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물.

청구항 103

프로테아솜 억제제에 대한 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 검정하는 방법으로서,

외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및

예를 들어, 반응 혼합물의 분취액에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, 또는 질량분광법에 의해 프로테아솜 억제제의 존재 또는 수준을 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 104

제103항에 있어서, 프로테아솜 억제제의 수준을 참조 값과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 비교에 반응하여,

집단을, 예를 들어, 필요조건을 충족하거나 필요조건을 충족하지 않는 것으로 분류하는 단계로서, 예를 들어, 프로테아솜 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 필요조건이 충족되는 단계,

예를 들어, 프로테아솜 억제제의 수준이 참조 값보다 위인 경우에 집단이 이후 정제 단계에 적합한 경우와 같이 집단을 이후의 처리 단계에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계,

집단을 치료제로 사용하기에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계, 또는

예를 들어, 프로테아솜 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 집단 또는 이의 분취액을 치료제로 사용하기 위해 제형화하거나 패키징하는 단계 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 106

제75항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 프로테아솜 억제제가 20S 프로테아솜 억제제, 예를 들어, MG-132 또는 카르필조립(carfilzomib), 또는 26S 프로테아솜 억제제, 예를 들어, 보르테조립(bortezomib)인 반응 혼합물 또는 방법.

청구항 107

제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법으로서,

- a) 적혈구 세포, 예를 들어, 성숙 단계의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- b) 적혈구 세포에 의한 제1 mRNA 및 제2 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 제1 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA 및 제2 외인성 단백질을 인코딩하는 제2 mRNA와 적혈구 세포를 접촉시킴으로써 제1 mRNA 및 제2 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 적혈구 세포가, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.

청구항 109

제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 발현하는 적혈구 세포의 집단을 생성하는 방법으로서,

- a) 적혈구 세포, 예를 들어, 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계, 및
- b) 제1 단백질을 인코딩하는 제1 mRNA 및 제2 단백질을 인코딩하는 제2 mRNA와 적혈구 세포의 집단을 접촉시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하고,

집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 제1 mRNA 및 제2 mRNA 둘 모두를 포함하는, 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 세포 당 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질의 평균 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.

청구항 111

제107항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 접촉 단계가 전기천공을 수행하는 것을 포함하는 방법.

청구항 112

제109항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 집단이, 세포가 제1 및 제2 mRNA와 접촉한 후 적어도 5일 동안 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%에서 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 113

집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 발현하는 적혈구 세포의 집단으로서, 상기 집단이 세포와 제1 또는 제2 외인성 단백질을 인코딩하는 DNA를 접촉시킴으로써 제조되지 않은, 적혈구 세포의 집단.

청구항 114

집단과 소정량의 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시킴으로써 소정량의 외인성 단백질을 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 세포 당 소정의 수의 카피의 외인성 단백질을 포함하는 복수의 적혈구 세포를 생성하는 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, 복수의 적혈구 세포(예를 들어, 제핵 적혈구 세포) 중 하나 이상을 평가하여 외인성 단백질의 양을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 116

적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포의 샘플에서 외인성 단백질의 양을 평가하는 방법으로서, 집단과 소정량의 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시킴으로써 제조된 세포 당 소정의 수의 외인성 단백질의 카피를 포함하는 복수의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및 복수의 적혈구 세포에서 외인성 단백질의 양을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 117

제114항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서,
 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.6 \pm 20\% \mu\text{g}$ 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $1,000,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.4 \pm 20\% \mu\text{g}$ 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $870,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.2 \pm 20\% \mu\text{g}$ 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $610,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.1 \pm 20\% \mu\text{g}$ 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $270,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.05 \pm 20\% \mu\text{g}$ 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $100,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.025 \pm 20\% \mu\text{g}$ 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $43,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키는, 방법.

청구항 118

제114항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 세포가 외인성 단백질과 접촉된 지 1일 후에 외인성 단백질을 발현하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 2016년 7월 7일에 출원된 미국 출원 일련 번호 62/359416호를 우선권으로 주장한다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이의 전체내용은 참조로서 본원에 포함된다. 2017년 7월 7일에 생성된 상기 ASCII 카피는 R2081-7015WO_SL.txt로 명명되며, 921 바이트 크기이다.

배경 기술

[0005] 적혈구 세포는, 예를 들어, 독성 대사물을 분해하거나, 생체이물질(xenobiotics)을 비활성화시키기 위한 약물 전달 시스템으로서, 그리고 기타 생체의학 분야에서 사용하기 위해 고려되어 왔다. 개선된 적혈구 세포 기반 약물 전달 시스템이 당 분야에 필요하다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 외인성 RNA(예를 들어, 단백질을 인코딩하는 외인성 RNA)를 포함하는 적혈구 세포와 관련된 조성물

및 방법을 포함한다. 외인성 RNA는 코딩 영역 및 이중성 비번역 영역(UTR), 예를 들어, 조절 요소를 포함하는 UTR을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 조합하여, 외인성 RNA는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 조합하여, 외인성 RNA는 조절 RNA, 예를 들어, miRNA일 수 있다. 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 일부 구현예에서, 외인성 RNA는 대조군에 비해 개선된 파라미터, 예를 들어, 안정성 또는 증가된 번역을 갖는다.

- [0007] 특정 양태에서, 본 발명의 개시는 이중성 비번역 영역(UTR)에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 제핵 적혈구 세포를 제공한다.
- [0008] 특정 양태에서, 본 발명의 개시는 이중성 비번역 영역(UTR)에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 제핵 적혈구 세포를 제공하며, 이중성 UTR은 조절 요소를 포함한다.
- [0009] 특정 양태에서, 본 발명의 개시는 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합)를 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 제공한다.
- [0010] 본 발명의 개시는 또한 하기 단계를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 방법을 제공한다:
- [0011] a) 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포와 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 접촉시키는 단계, 및
- [0012] b) 외인성 mRNA의 흡수에 적합한 조건하에서 접촉된 적혈구 세포를 유지시킴으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 단계.
- [0013] 본 발명의 개시는 또한 하기 단계를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 방법을 제공한다:
- [0014] a) 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포와 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 외인성 mRNA를 접촉시키는 단계; 및
- [0015] b) 외인성 mRNA의 흡수에 적합한 조건하에서 접촉된 적혈구 세포를 유지시킴으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 단계.
- [0016] 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 제핵 적혈구 세포에서 외인성 단백질을 생성하는 방법을 추가로 제공한다:
- [0017] a) 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0018] b) 외인성 단백질의 생성에 적합한 조건하에서 적혈구 세포를 배양함으로써 외인성 단백질을 생성하는 단계.
- [0019] 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 제핵 적혈구 세포에서 외인성 단백질을 생성하는 방법을 추가로 제공한다:
- [0020] a) 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0021] b) 외인성 단백질의 생성에 적합한 조건하에서 적혈구 세포를 배양함으로써 외인성 단백질을 생성하는 단계.
- [0022] 특정 양태에서, 본 발명의 개시는 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 대상체에 투여함으로써 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 단계를 포함하는, 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

- [0023] 특정 양태에서, 본 발명의 개시는 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 대상체에 투여함으로써 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 단계를 포함하는, 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0024] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치(batch))를 평가하는 방법을 제공한다:
- [0025] a) 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 제공하는 단계, 및
- [0026] b) 미리 선택된 파라미터에 대해 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가함으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가하는 단계.
- [0027] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가하는 방법을 제공한다:
- [0028] a) 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0029] b) 미리 선택된 파라미터에 대해 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가함으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가하는 단계.
- [0030] 특정 양태에서, 본 발명의 개시는 a) 코딩 영역 및 이중성 UTR을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)와 적혈구 세포를 접촉시키는 단계, 및 b) 외인성 단백질의 생성에 적합한 조건하에서 적혈구 세포를 배양함으로써 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 외인성 단백질을 포함하는 복수의 제핵 적혈구 세포를 생성하는 방법을 제공한다.
- [0031] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 또는 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 제핵 적혈구 세포를 제공한다.
- [0032] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 외인성 단백질을 포함하는 복수의 제핵 적혈구 세포를 생성하는 방법을 제공한다:
- [0033] a) 적혈구 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 본원에 기재된 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 접촉시키는 단계로서, 외인성 mRNA가 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 또는 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 단계, 및
- [0034] b) 외인성 단백질의 생성에 적합한 조건하에서 적혈구 세포를 배양함으로써 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 생성하는 단계.
- [0035] 특정 양태에서, 본 발명의 개시는 a) 적혈구 세포 막횡단 단백질, 예를 들어, GPA 또는 Kell을 인코딩하는 코딩 영역, 및 b) 이중성 UTR, 예를 들어, 하나 이상의 조절 요소를 포함하는 UTR 또는 헤모글로빈 3' UTR을 포함하는 RNA 분자를 제공한다.
- [0036] 특정 양태에서, 본 발명의 개시는 a) 적혈구 세포 막횡단 단백질, 예를 들어, GPA 또는 Kell을 인코딩하는 코딩 영역, 및 b) 본원에 기재된 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 표 1, 2, 또는 3의 뉴클레오티드를 포함하는 RNA 분자를 제공한다.
- [0037] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 적혈구 세포, 예를 들어, 적혈구 세포 전구체와 본원에 기재된 하나 이상의 핵산을 접촉시키는 단계 및 핵산의 발현을 가능하게 하는 조건하에 세포를 배치하는 단계를 제공하는 본원에 기재된 적혈구 세포를 생성하는 방법을 제공한다.
- [0038] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 본원에 기재된 복수의 적혈구 세포, 예를 들어, 적어도 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} ,

또는 10^{12} 개의 세포를 포함하는 제조물, 예를 들어, 약학적 제조물을 제공한다.

- [0039] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 성숙 단계 동안, 예를 들어, 성숙 단계 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 동안 외인성 mRNA와 적혈구 세포를 접촉시키는 방법을 제공한다.
- [0040] 본원의 양태 중 임의의 양태, 예를 들어, 상기 양태는 본원의 구현예 중 하나 이상, 예를 들어, 하기 구현예를 특징으로 할 수 있다.
- [0041] 일부 구현예에서, 본원의 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0042] c) 외인성 RNA의 흡수 후 적혈구 세포를 배양하는 단계.
- [0043] 구현예들에서, UTR은 대상 코딩 영역이 아닌 코딩 영역에 자연적으로 작동 가능하게 연결되어 발생하거나, 상기 자연 발생 UTR과 적어도 70, 80, 90, 95, 99, 또는 100%의 상동성을 갖는다. 구현예들에서, UTR은 대상 코딩 영역과 함께 자연 발생하지 않고, 예를 들어, 대상 코딩 영역과 자연적으로 작동 가능하게 연결되어 발생하는 UTR과 적어도 1개의 뉴클레오티드, 예를 들어, 이의 뉴클레오티드의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50%만큼 상이하다. 구현예들에서, UTR은 사실상 존재하지 않는다.
- [0044] 구현예들에서, UTR은 3' UTR을 포함한다. 구현예들에서, UTR은 5' UTR을 포함한다. 구현예들에서, 이중성 UTR은 5' UTR이고, 외인성 mRNA는 이중성 3' UTR을 추가로 포함한다. 구현예들에서, UTR은 인트론에 해당하는 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA는 대안적 스플라이싱을 겪을 수 있으며, 예를 들어, 복수의 스플라이스 아이소형을 인코딩할 수 있다. 구현예들에서, 대안적 스플라이싱은 엑손 스킵핑(exon skipping), 대안적인 5' 공여체 부위 사용, 대안적 3' 수용체 부위 사용, 또는 인트론 보유를 포함한다. 일 구현예에서, UTR은 코딩 영역 내에 인트론을 포함한다. 일 구현예에서, 코딩 영역 내의 인트론은 UTR을 포함한다. 일 구현예에서, UTR은 인트론을 포함하는 5' UTR이다.
- [0045] 구현예들에서, 제핵 적혈구 세포는 제2의 UTR을 추가로 포함한다. 구현예들에서, 제핵 적혈구는 3' UTR 및 5' UTR을 포함한다.
- [0046] 구현예들에서, UTR은 야생형 인간 세포에서 자연 발생한다. 구현예들에서, UTR은 야생형 인간 세포에서 자연 발생하지 않는다.
- [0047] 구현예들에서, 코딩 영역은 야생형 인간 세포에서 자연 발생하고/하거나, 야생형 인간 세포에서 자연 발생하는 단백질을 인코딩한다. 구현예들에서, 코딩 영역은 야생형 인간 세포에서 자연 발생하지 않고/않거나, 야생형 인간 세포에서 자연 발생하지 않는 단백질을 인코딩한다. 구현예들에서, UTR은 야생형 적혈구 세포에서 발현되는 코딩 영역, 예를 들어, 헤모글로빈 코딩 영역과 자연적으로 작동 가능하게 연결되어 발생한다.
- [0048] 구현예들에서, UTR은, 예를 들어, SEQ ID NO:1의 서열 또는 이와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 갖는 글로빈 UTR, 예를 들어, 헤모글로빈 UTR이다.
- [0049] 구현예들에서, 코딩 영역은 표 4에 나열된 효소, 항체 분자, 보체 조절 단백질, 키레이트제, 또는 단백질을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리펩티드는 페닐알라닌 암모니아 분해효소(PAL) 또는 이의 페닐알라닌-대사 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0050] 구현예들에서, 세포는 외인성 mRNA에 의해 인코딩되는 단백질을 추가로 포함한다. 구현예들에서, 세포는 외인성 mRNA를 인코딩하는 DNA를 포함하지 않는다.
- [0051] 일부 구체예에서, 세포는 저장성으로 로딩되지 않았거나, 저장성으로 로딩되지 않는다.
- [0052] 구현예들에서, 외인성 mRNA는 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 화학적 백본 변형, 또는 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 구현예들에서, 복수의 세포 중 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 85%가 외인성 단백질을 생성한다. 구현예들에서, 세포 집단은 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 세포 생활력을 갖는다.
- [0053] 구현예들에서, 상기 방법은 형질감염, 전기천공, 저장성 로딩, 세포 압력에서의 변화, 세포 변형(예를 들어, CellSqueeze), 또는 외인성 RNA가 세포로 진입하도록 하기 위해 세포막을 파괴하기 위한 다른 방법을 포함한다.
- [0054] 구현예들에서, 외인성 mRNA는 유사한 적혈구 세포에서 화학적 변형이 결여된 상응하는 mRNA의 반감기보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 크거나, 2배, 5배, 10배, 20배, 또는 100배 더 큰 반감기를 갖는다. 구현예들에서, 외인성 mRNA는 mRNA의 도입 후 유사한 시점에서 측정시 달리 유사한 적혈구 세

포에서 화학적 변형이 걸여된 동일한 서열의 mRNA의 수준보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 크거나, 2배, 5배, 10배, 20배, 또는 100배 더 큰 수준으로 적혈구 세포에 존재한다.

- [0055] 구현예들에서, 외인성 단백질은 mRNA의 도입 후 유사한 시점에서 측정시 달리 유사한 적혈구 세포에서 화학적 변형이 걸여된 동일한 서열의 mRNA에 의해 생성된 단백질의 수준보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 크거나, 2배, 5배, 10배, 20배, 또는 100배 더 큰 수준으로 적혈구 세포에 존재한다. 구현예들에서, 시점은 세포가 mRNA와 접촉된 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 또는 28일이다. 구현예들에서, 화학적 변형은 슈도우리딘을 포함한다. 구현예들에서, mRNA는 캡을 추가로 포함한다. 구현예들에서, mRNA는 polyA 꼬리를 추가로 포함한다.
- [0056] 구현예들에서, 외인성 단백질은 mRNA의 도입 후 유사한 시점에서 측정시 달리 유사한 적혈구 세포에서 polyA 꼬리가 걸여된 동일한 서열의 mRNA에 의해 생성된 단백질의 수준보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 더 크거나, 2배, 5배, 10배, 20배, 또는 100배 더 큰 수준으로 적혈구 세포에 존재한다. 구현예들에서, 시점은 세포가 mRNA와 접촉된 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 또는 28일이다.
- [0057] 구현예들에서, 본원에 기재된 세포는 이중성 UTR, 예를 들어, 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR을 포함하며, 화학적 변형을 추가로 포함하고, 예를 들어, 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 접촉 단계(예를 들어, 적혈구 세포와 mRNA를 접촉시킴)는 세포의 제핵 전에 발생하고, 다른 구현예에서, 접촉 단계는 세포의 제핵 후에 발생한다. 구현예들에서, 접촉 단계는 복수의 제핵 세포 및 복수의 유핵 세포를 포함하는 세포의 집단에 대해 수행된다. 세포의 집단은, 예를 들어, 주로 유핵 세포 집단이거나 주로 제핵 세포 집단일 수 있다. 구현예들에서, 상기 방법은 제핵에 적합한 조건하에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0059] 본원의 방법 중 임의의 방법의 일부 구현예에서, 제공 단계는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포와 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 접촉시키는 것을 포함한다. 구현예들에서, 제공 단계는 또 다른 존재물로부터의 적혈구 세포를 수용하는 것을 포함한다.
- [0060] 구현예들에서, 본원에 기재된 파라미터는 외인성 단백질을 발현하는 능력; 외인성 단백질의 구조 또는 기능; 내인성 mRNA를 포함하는 세포의 비율; 내인성 단백질을 포함하는 세포의 비율; 세포에서의 외인성 mRNA의 수준; 세포에서의 외인성 단백질의 수준; 세포 증식률; 또는 세포 분화 상태에서부터 선택된다. 구현예들에서, 상기 방법은 미리 선택된 파라미터에 대한 값을 참조와 비교하는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 파라미터에 대한 값에 대한 반응, 또는 상기 값과 참조의 비교, 세포 또는 세포 배치의 분류, 승인, 또는 거부를 포함한다.
- [0061] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 세포의 집단에 배치된다. 구현예들에서, 세포의 집단은 본원에 기재된 바와 같은 복수의 세포를 포함하며, 선택적으로 하나 이상의 다른 세포, 예를 들어, 외인성 mRNA가 걸여된 야생형 적혈구 세포, 유핵 적혈구 세포, 또는 비-적혈구 세포를 추가로 포함한다. 구현예들에서, 세포의 집단은 적어도 제1 외인성 RNA를 포함하는 제1 세포 및 제2 외인성 RNA를 포함하는 제2 세포를 포함한다. 구현예들에서, 세포의 집단은 적어도 제1 외인성 RNA 및 제2 외인성 RNA를 포함하는 제1 세포를 포함한다.
- [0062] 구현예들에서, RNA는 시험관 내 전사 또는 고상 화학 합성에 의해 생성된다.
- [0063] 일부 구현예에서, 예를 들어, 성숙 단계 동안 적혈구 세포와 외인성 mRNA를 접촉시키는 것을 포함하는 구현예에서, 접촉은 전기천공을 포함한다. 일부 구현예에서, 접촉은 성숙의 6 내지 8일, 5 내지 9일, 4 내지 10일, 3 내지 11일, 2 내지 12일, 또는 1 내지 13일 사이에 수행된다. 일부 구현예에서, 접촉은 성숙의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일에 또는 그 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 접촉 후 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 또는 20일 동안 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 접촉 후, 예를 들어, 세포와 mRNA를 접촉시킨 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일에 트랜스제닉 mRNA의 발현을 시험하는 단계, 예를 들어, 트랜스제닉 mRNA에 의해 인코딩된 단백질의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0064] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법을 제공한다:

- [0065] a) 성숙 단계의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0066] b) 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA와 적혈구 세포를 접촉(예를 들어, 전기천공)시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계.
- [0067] 구현예들에서, 상기 방법은 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 상기 집단과 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 집단의 복수의 적혈구 세포는 각각 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 흡수한다. 구현예들에서, 세포는 외인성 단백질을 발현한다. 구현예들에서, 세포는 외인성 단백질을 포함한다. 구현예들에서, 집단 내의 복수의 세포는 외인성 단백질을 발현한다. 구현예들에서, 성숙 단계의 세포의 집단은 3 내지 7일, 예를 들어, 4 내지 5일 또는 4 내지 6일 동안 성숙 배지에서 확장된 세포의 집단이다. 구현예들에서, 성숙 단계의 세포의 집단은, 예를 들어, 특정 백분율의 제핵, 번역 활성화, 또는 세포 표면 마커 발현을 갖는 본원에 기재된 집단이다.
- [0068] 구현예들에서, 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 외인성 단백질을 포함한다. 구현예들에서, 집단 내의 세포는, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000 카피의 외인성 단백질을 포함한다. 구현예들에서, 세포는 mRNA와의 접촉 후 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일 동안 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000 카피의 외인성 단백질을 포함한다. 구현예들에서, 세포는 mRNA와의 접촉 후 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일 동안 적어도 1,000 카피의 외인성 단백질을 포함한다.
- [0069] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법을 제공한다:
- [0070] a) 성숙 단계의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0071] b) 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA와 적혈구 세포를 접촉시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계.
- [0072] 구현예들에서, 상기 방법은 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 적혈구 세포 집단의 복수의 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단은 3 내지 7일, 예를 들어, 4 내지 5일 또는 4 내지 6일 동안 성숙 배지에서 확장된 세포의 집단이다. 구현예들에서, 적혈구 세포의 집단은 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개 이상)을 포함하는 적혈구 세포의 집단이다:
- [0073] i.a) 집단 내의 세포의 2 내지 40%, 3 내지 33%, 5 내지 30%, 10 내지 25%, 또는 15 내지 20%가 제핵되거나;
- [0074] i.b) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 2%, 3%, 4%, 또는 5% 미만이 제핵되거나;
- [0075] i.c) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 6%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만이 제핵되거나;
- [0076] i.d) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 미만이 제핵되거나;
- [0077] i.e) 집단 내의 세포의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하가 제핵되거나;
- [0078] i.f) 집단 내의 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 이하가 제핵되거나;
- [0079] i.g) 세포의 집단이 최대 제핵의 6 내지 70%, 10 내지 60%, 20 내지 50%, 또는 30 내지 40%에 도달하거나;
- [0080] i.h) 세포의 집단이 최대 제핵의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하에 도달하거나;
- [0081] i.i) 세포의 집단이 최대 제핵의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 60% 이하에 도달하거나;
- [0082] ii.a) 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토(plateau)로부터 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가하거나;
- [0083] ii.b) 세포의 집단이 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가할 수 있거나;
- [0084] ii.c) 집단이 집단 내의 세포의 적어도 70%의 제핵 수준에 도달하기 전에 집단이 1.5, 2, 또는 3배 이하만큼 증

가하거나;

- [0085] iii.a) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0086] iii.b) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0087] iii.c) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0088] iii.d) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0089] iii.e) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0090] iii.f) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타낸다.
- [0091] 구현예들에서, 복수의 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키기 전 또는 후에, 복수의 세포는 적혈구 세포의 집단으로부터 분리되고, 예를 들어, 복수의 세포는 제핵 상태를 기초로 하여 집단으로부터 분리된다(예를 들어, 복수의 세포는 유허 세포이고, 집단의 나머지는 제핵 세포이다).
- [0092] 구현예들에서, 복수의 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키기 전 또는 후에, 상기 방법은, 예를 들어, 집단과 제핵의 억제제(예를 들어, 히스톤 데아세틸라제(HDAC)의 억제제, 미토겐-활성화 단백질 키나제(MAPK)의 억제제, 사이클린-의존성 키나제(CDK)의 억제제, 또는 프로테아솜 억제제)를 인큐베이션함으로써, 예를 들어, 집단의 성장, 발달, 헤모글로빈 합성, 또는 제핵 과정을 정지시킴으로써 적혈구 세포의 집단의 분화 단계를 동기화시키는 단계를 추가로 포함한다. 구현예들에서, 정지는 집단 내의 세포의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10% 초과인 제핵 전에 발생한다.
- [0093] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구의 집단을 제조하는 방법을 제공한다:
- [0094] (a) 적혈구 전구 세포(예를 들어, CD34+ 세포)의 집단을 제공하는 단계;
- [0095] (b) 분화하는 적혈구 세포의 집단을 제공하는 분화 조건하에서 적혈구 전구 세포의 집단을 배양하는 단계;
- [0096] (c) 분화하는 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA와 분화하는 적혈구 세포를 접촉시키는 단계로서, 분화하는 적혈구 세포의 집단이 0.1 내지 25%가 제핵(예를 들어, 0.1 내지 20%가 제핵되거나, 0.1 내지 15%가 제핵되거나, 0.1 내지 12%가 제핵되거나, 0.1 내지 10%가 제핵됨)되는 경우에 접촉이 수행되는, 단계; 및
- [0097] (d) 분화하는 적혈구 세포를 추가로 배양하여 망상적혈구 집단을 제공함으로써, 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구 집단을 제조하는 단계.
- [0098] 구현예들에서, 추가 배양은 3, 2, 또는 1회 미만의 집단 배가를 포함한다. 구현예들에서, 분화하는 적혈구 세포의 적어도 50%(적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 95%)가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내는 경우에 접촉이 수행된다.
- [0099] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 (a) 적혈구 전구 세포의 집단을 제공하는 단계, (b) 분화하는 적혈구 세포의 집단을 제공하는 분화 조건하에서 적혈구 전구 세포의 집단을 배양하는 단계, (c) 분화하는 적혈구 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계로서, 분화하는 적혈구 세포의 집단이 0.1 내지 25%가 제핵(예를 들어, 0.1 내지 20%가 제핵되거나, 0.1 내지 15%가 제핵되거나, 0.1 내지 12%가 제핵되거나, 0.1 내지 10%가 제핵됨)되는 경우에 접촉이 수행되는, 단계를 포함하는, 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구의 집단을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0100] 구현예들에서, 분화하는 적혈구 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토 전에 3, 2, 또는 1회 미만의 집단 배가를 갖는 경우에 접촉이 수행된다. 구현예들에서, 분화하는 적혈구 세포의 적어도 50%(적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 95%)가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내는 경우에 접촉이 수행된다.

- [0101] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법을 제공한다:
- [0102] mRNA의 분해를 억제하는 조건, 예를 들어, 반응 혼합물 중에 리보뉴클레아제 억제제의 포함에 의한 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA 및 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및
- [0103] 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 반응 혼합물을 유지시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계.
- [0104] 구현예들에서, 상기 방법은 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 상기 집단과 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 집단의 복수의 적혈구 세포는 각각 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 흡수한다. 구현예들에서, 세포 또는 복수의 세포는 외인성 단백질을 발현한다. 구현예들에서, 세포 또는 복수의 세포는 외인성 단백질을 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 세포 또는 세포의 집단을 전기천공하는 단계를 추가로 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 적혈구 세포의 집단과 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 세포와 mRNA를 접촉시키기 전, 접촉시키는 동안, 또는 접촉시킨 후에 세포 집단과 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 성숙 단계의 4, 5, 또는 6일에서 세포와 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 세포는 성숙 단계의 세포이다. 구현예들에서, 성숙 단계의 세포의 집단은, 예를 들어, 특정 백분율의 제핵, 번역 활성, 또는 세포 표면 마커 발현을 갖는 본원에 기재된 집단이다.
- [0105] 구현예들에서, mRNA는 시험관 내 전사된 mRNA이다.
- [0106] 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%(및 선택적으로 95% 이하)는 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 생존 가능(예를 들어, Annexin V 염색에 의해 결정됨)하다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%는 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵된다. 구현예들에서, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 세포의 비율은 리보뉴클레아제 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단에서 제핵되는 세포의 비율의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%이다. 구현예들에서, 세포의 집단은 세포가 mRNA와 접촉시에 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 개의 세포를 포함한다. 구현예들에서, 세포의 집단은 세포가 mRNA와 접촉된 후 5일 이내에 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 확장된다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질을 발현한다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함한다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 1,000개의 카피를 포함한다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 10,000개의 카피를 포함한다. 구현예들에서, 세포의 집단은 리보뉴클레아제 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상, 또는 적어도 2배, 3배, 4배, 또는 5배 더 많은 외인성 단백질을 포함한다.
- [0107] 본 발명의 개시는 또한, 일부 양태에서, i) 적혈구 세포, ii) 외인성 단백질을 포함하는 mRNA 및 iii) 리보뉴클레아제 억제제를 포함하는 반응 혼합물을 제공한다.
- [0108] 구현예들에서, mRNA는 적혈구 세포 내에 있다. 구현예들에서, 반응 혼합물은 복수의 적혈구 세포를 포함한다.
- [0109] 본 발명의 개시는 또한, 일부 양태에서, 하기 단계를 포함하는 리보뉴클레아제 억제제에 대한 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 검정하는 방법을 제공한다:
- [0110] 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및
- [0111] 예를 들어, 반응 혼합물의 분취액에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, 또는 질량분광법에 의해 리보뉴클레아제 억제제의 존재 또는 수준을 검정하는 단계.
- [0112] 구현예들에서, 상기 방법은 리보뉴클레아제 억제제의 수준을 참조 값과 비교하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0113] 구현예들에서, 상기 방법은 비교에 반응하여 하기 단계 중 하나 이상을 수행하는 것을 추가로 포함한다:

- [0114] 집단을, 예를 들어, 필요조건을 충족하거나 필요조건을 충족하지 않는 것으로 분류하는 단계로서, 예를 들어, 리보뉴클레아제 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 필요조건이 충족되는 단계,
- [0115] 예를 들어, 리보뉴클레아제 억제제의 수준이 참조 값보다 위인 경우에 집단이 이후 정제 단계에 적합한 경우와 같이 집단을 이후의 처리 단계에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계,
- [0116] 집단을 치료제로 사용하기에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계, 또는
- [0117] 예를 들어, 리보뉴클레아제 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 집단 또는 이의 분취액을 치료제로 사용하기 위해 제형화하거나 패키징하는 단계.
- [0118] 구현예들에서, 리보뉴클레아제 억제제는 RNAsin Plus(예를 들어, Promega 제품), Protector RNase Inhibitor(예를 들어, Sigma 제품), 또는 Ribonuclease Inhibitor Huma(예를 들어, Sigma 제품)이다.
- [0119] 본 발명의 개시는 또한, 일부 양태에서, 하기 단계를 포함하는 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법을 제공한다:
- [0120] 단백질 분해를 억제하는 조건, 예를 들어, 반응 혼합물 중에 프로테아제 억제제, 예를 들어, 프로테아솜 억제제의 포함에 의한 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA 및 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및
- [0121] 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 반응 혼합물을 유지시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계.
- [0122] 구현예들에서, 상기 방법은 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 상기 집단과 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 집단의 복수의 적혈구 세포는 각각 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 흡수한다. 구현예들에서, 세포 또는 복수의 세포는 외인성 단백질을 발현한다. 구현예들에서, 세포 또는 복수의 세포는 외인성 단백질을 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 세포 또는 세포의 집단을 전기천공하는 단계를 추가로 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 적혈구 세포의 집단과 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 세포와 mRNA를 접촉시키기 전, 접촉시키는 동안, 또는 접촉시킨 후, 예를 들어, 세포와 mRNA를 접촉시키기 0.5 내지 2일 전 또는 0.5 내지 2일 후에 세포 집단과 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 세포와 mRNA를 접촉시키기 0.5 내지 2일 전에 세포 집단과 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 전기천공 전에 프로테아솜 억제제를 제거(예를 들어, 세포 세척에 의한)하는 단계를 포함한다.
- [0123] 구현예들에서, 상기 방법은 성숙 3 내지 7일, 예를 들어, 성숙 단계 4, 5, 또는 6일에서 세포와 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함한다. 구현예들에서, 세포는 성숙 단계의 세포이다. 구현예들에서, 성숙 단계의 세포의 집단은, 예를 들어, 특정 백분율의 제핵, 번역 활성, 또는 세포 표면 마커 발현을 갖는 본원에 기재된 집단이다.
- [0124] 구현예들에서, mRNA는 시험관 내 전사된 mRNA이다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 생존 가능하다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%는 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵된다. 구현예들에서, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 세포의 비율은 프로테아솜 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단에서 제핵되는 세포의 비율의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%이다. 구현예들에서, 세포의 집단은 세포가 mRNA와 접촉시에 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 개의 세포를 포함한다.
- [0125] 구현예들에서, 세포의 집단은 세포가 mRNA와 접촉된 후 5일 이내에 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 확장된다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질을 발현한다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함한다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 1,000개의 카피를 포함한다. 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 10,000개의 카피를 포함한다. 구현예들에서, 세포의 집단은 프로테아솜 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세

포 집단보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상, 또는 적어도 2배, 3배, 4배, 또는 5배 더 많은 외인성 단백질을 포함한다.

- [0126] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 i) 적혈구 세포, ii) 외인성 단백질을 포함하는 mRNA 및 iii) 프로테아솜 억제제를 포함하는 반응 혼합물을 제공한다.
- [0127] 구현예들에서, mRNA는 적혈구 세포 내에 있다. 구현예들에서, 반응 혼합물은 복수의 적혈구 세포를 포함한다.
- [0128] 본 발명의 개시는 또한, 일부 양태에서, 하기 단계를 포함하는 프로테아솜 억제제에 대한 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 검정하는 방법을 제공한다:
- [0129] 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및
- [0130] 예를 들어, 반응 혼합물의 분취액에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, 또는 질량분광법에 의해 프로테아솜 억제제의 존재 또는 수준을 검정하는 단계.
- [0131] 구현예들에서, 상기 방법은 또한 프로테아솜 억제제의 수준을 참조 값과 비교하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0132] 구현예들에서, 상기 방법은 비교에 반응하여 하기 단계 중 하나 이상을 수행하는 것을 추가로 포함한다:
- [0133] 집단을, 예를 들어, 필요조건을 충족하거나 필요조건을 충족하지 않는 것으로 분류하는 단계로서, 예를 들어, 프로테아솜 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 필요조건이 충족되는 단계,
- [0134] 예를 들어, 프로테아솜 억제제의 수준이 참조 값보다 위인 경우에 집단이 이후 정제 단계에 적합한 경우와 같이 집단을 이후의 처리 단계에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계,
- [0135] 집단을 치료제로 사용하기에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계, 또는
- [0136] 예를 들어, 프로테아솜 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 집단 또는 이의 분취액을 치료제로 사용하기 위해 제형화하거나 패키징하는 단계.
- [0137] 구현예들에서, 프로테아솜 억제제는 20S 프로테아솜 억제제, 예를 들어, MG-132 또는 카르필조밐(carfilzomib), 또는 26S 프로테아솜 억제제, 예를 들어, 보르테조밐(bortezomib)이다.
- [0138] 구현예들에서, 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법은,
- [0139] a) 적혈구 세포, 예를 들어, 성숙 단계의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0140] b) 적혈구 세포에 의한 제1 mRNA 및 제2 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 제1 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA 및 제2 외인성 단백질을 인코딩하는 제2 mRNA와 적혈구 세포를 접촉시킴으로써 제1 mRNA 및 제2 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함한다.
- [0141] 구현예들에서, 적혈구 세포는, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함한다.
- [0142] 본 발명의 개시는 또한, 일부 양태에서, 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 발현하는 적혈구 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은
- [0143] a) 적혈구 세포, 예를 들어, 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계, 및
- [0144] b) 제1 단백질을 인코딩하는 제1 mRNA 및 제2 단백질을 인코딩하는 제2 mRNA와 적혈구 세포의 집단을 접촉시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하고,
- [0145] 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 제1 mRNA 및 제2 mRNA 둘 모두를 포함한다.
- [0146] 구현예들에서, 적혈구 세포의 집단은, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 세포 당 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질의 평균 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함한다.
- [0147] 구현예들에서, 접촉 단계는 전기천공을 수행하는 것을 포함한다.
- [0148] 구현예들에서, 세포의 집단은, 세포가 제1 및 제2 mRNA와 접촉한 후 적어도 5일 동안 세포의 적어도 80%, 85%,

90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%에서 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 포함한다. 구현예들에서, 세포의 집단은, 세포가 제1 및 제2 mRNA와 접촉한 후 적어도 2, 4, 6, 8, 10, 12, 또는 14일 동안 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%에서 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 포함한다. 구현예들에서, 세포의 집단은, 세포가 제1 및 제2 mRNA와 접촉한 후 적어도 2, 4, 6, 8, 10, 12, 또는 14일 동안 세포의 적어도 80%에서 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 포함한다.

- [0149] 구현예들에서, 제1 외인성 단백질은 제2 외인성 단백질의 아미노산 길이보다 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하로 더 긴 아미노산 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 제2 외인성 단백질의 평균 수준은 적혈구 세포 집단에서 제1 외인성 단백질의 수준의 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하이다.
- [0150] 구현예들에서, 제1 외인성 단백질은 제2 외인성 단백질의 아미노산 길이보다 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2배, 또는 3배 더 긴 아미노산 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 제2 외인성 단백질의 평균 수준은 적혈구 세포 집단에서 제1 외인성 단백질의 수준보다 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2배, 또는 3배 더 높다.
- [0151] 본 발명의 개시는 또한, 특정 양태에서, 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 발현하는 적혈구 세포의 집단을 제공하며, 상기 집단은 세포와 제1 또는 제2 외인성 단백질을 인코딩하는 DNA를 접촉시킴으로써 제조되지 않았다.
- [0152] 본 발명의 개시는 또한, 특정 양태에서, 집단과 소정량의 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시킴으로써 소정량의 외인성 단백질을 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 세포 당 소정의 수의 외인성 단백질의 카피를 포함하는 복수의 적혈구 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 구현예들에서, 상기 방법은 복수의 적혈구 세포(예를 들어, 제핵 적혈구 세포) 중 하나 이상을 평가하여 외인성 단백질의 양을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0153] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 하기 단계를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포의 샘플에서 외인성 단백질의 양을 평가하는 방법을 제공한다:
- [0154] 집단과 소정량의 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시킴으로써 제조된 세포 당 소정의 수의 외인성 단백질의 카피를 포함하는 복수의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0155] 복수의 적혈구 세포에서 외인성 단백질의 양을 결정하는 단계.
- [0156] 일부 구현예에서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0157] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.6 \pm 50\%$, $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $1,000,000 \pm 50\%$, $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키는 단계,
- [0158] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.4 \pm 50\%$, $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $870,000 \pm 50\%$, $\pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키는 단계,
- [0159] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.2 \pm 50\%$, $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $610,000 \pm 50\%$, $\pm 20\%$, 또는 $\pm 10\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키는 단계,
- [0160] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.1 \pm 50\%$, $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $270,000 \pm 50\%$, $\pm 20\%$, 또는 $\pm 10\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키는 단계,
- [0161] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.05 \pm 50\%$, $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $100,000 \pm 50\%$, $\pm 20\%$, 또는 $\pm 10\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키는 단계, 또는
- [0162] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.025 \pm 50\%$, $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $43,000 \pm 50\%$, $\pm 20\%$, 또는 $\pm 10\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키는 단계.
- [0163] 구현예들에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는 세포가 외인성 단백질과 접촉된 지 1일 후에 외인성 단백질을 발현한다.
- [0164] 본원의 양태 중 임의의 양태의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 적혈구 세포의 집단(예를 들어, mRNA와 접촉되는 세포의 집단)은 하기 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 이상)에 해당하는 적혈구 세포의 집단이다:
- [0165] 집단 내의 세포의 2 내지 40%, 3 내지 33%, 5 내지 30%, 10 내지 25%, 또는 15 내지 20%가 제핵되거나;

- [0166] 집단 내의 세포의 3%, 5%, 10%, 20%, 또는 30% 미만이 제핵되거나;
- [0167] 집단 내의 세포의 0% 초과(예를 들어, 0.1%, 0.2%, 0.5%) 및 50% 이하(40%, 30%, 20%, 18%, 15%, 12%, 10%)가 제핵되거나;
- [0168] 세포의 집단이 최대 제핵의 6 내지 70%, 10 내지 60%, 20 내지 50%, 또는 30 내지 40%에 도달하거나;
- [0169] 세포의 집단이 최대 제핵의 6%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 60% 미만에 도달하거나;
- [0170] 세포의 집단이 BONCAT 검정, 예를 들어, 실시예 10의 번역 검정에 의해 측정시 적어도 600,000, 800,000, 1,000,000, 1,200,000, 1,400,000, 1,600,000, 1,800,000, 2,000,000, 2,200,000, 또는 2,400,000의 번역 활성을 갖거나;
- [0171] 세포의 집단이 BONCAT 검정, 예를 들어, 실시예 10의 번역 검정에 의해 측정시 600,000 내지 2,400,000, 800,000 내지 2,200,000, 1,000,000 내지 2,000,000, 1,200,000 내지 1,800,000, 또는 1,400,000 내지 1,600,000의 번역 활성을 갖거나;
- [0172] 성숙 단계의 세포의 집단이 최대 번역 활성의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 갖고, 최대 번역 활성이 유사한 수의 성숙 단계의 세포의 전구체 또는 전구 세포, 예를 들어, CD34+ 세포의 최대 번역 활성을 나타내거나;
- [0173] 집단 내의 세포의 0.1 내지 25%가 제핵되고, 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토로부터 1, 2, 또는 3회 미만으로 집단 배가하거나;
- [0174] 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토로부터 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가하거나;
- [0175] 세포의 집단이 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가할 수 있거나;
- [0176] 집단이 집단 내의 세포의 적어도 70%의 제핵 수준에 도달하기 전에 집단이 1.5, 2, 또는 3배 이하만큼 증가하거나;
- [0177] 집단 내의 세포의 84 내지 99%, 85 내지 95%, 또는 약 90%가 GPA-양성(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정됨)이거나;
- [0178] 집단 내의 세포의 84%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 GPA-양성(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정됨)이거나;
- [0179] 집단 내의 세포의 54 내지 99%, 55 내지 98%, 60 내지 95%, 65 내지 90%, 70 내지 85%, 또는 75 내지 80%가 band3-양성(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정됨)이거나;
- [0180] 집단 내의 세포의 적어도 54%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%가 band3-양성(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정됨)이거나;
- [0181] 집단 내의 세포의 96 내지 100%, 97 내지 99%, 또는 약 98%가 alpha4 인테그린-양성(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정됨)이거나;
- [0182] 집단 내의 세포의 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 alpha4 인테그린-양성(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정됨)이거나;
- [0183] 집단 내의 세포의 적어도 50%(예를 들어, 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%)가 alpha4 인테그린-양성 및 band3-양성이거나;
- [0184] 집단 내의 세포의 적어도 50%가 band3-양성이고, 적어도 90% 내지 95%가 alpha4 인테그린-양성이다.
- [0185] 본 발명의 개시는 상기 양태 및/또는 구현에 중 어느 하나 이상의 모든 조합뿐만 아니라 상세한 설명 및 실시예에 기재된 구현에 중 어느 하나 이상과의 조합을 고려한다.
- [0186] 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 이용될 수 있으나, 적합한 방법 및 물질이 하기에 기재된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고문헌(예를 들어, 서열 데이터베이스 참조 번호)은 이들의 전체내용이 참조로서 포함된다. 예를 들어, 본원의 임의의 표에서 본원에 참조된 모든 GenBank, Unigene, 및 Entrez 서열은 참조로서 포함된다. 달리 명시하지 않는 한, 본원의 임의의 표를 포함하는 본원에 명시된 서열 등록 번호는 2016년 7월 7일 현재의 데이터베이스 항목을 참조한다.

하나의 유전자 또는 단백질이 복수의 서열 등록 번호를 언급하는 경우, 서열 변이체 모두가 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0187]

도 1은 렌티바이러스 형질도입 후의 K562 적백혈병 세포에 대한 상이한 크기의 다양한 작제물의 발현을 제시하는 플롯이다. 각각의 데이터 포인트는 고유한 작제물을 나타낸다. 각각의 작제물이 적절한 에피토프 태그를 함유하므로 발현은 항-HA 항체를 이용한 유세포분석에 의해 측정된다. 작제물은 표적 세포 유전체로 통합될 바이러스 유전체(트랜스진 자체를 포함함) 내의 핵산의 길이인 프로바이러스 길이에 의해 배열된다.

도 2는 프로바이러스가 약 3.5 kb 내지 약 8.5 kb 범위가 되도록 하는 다양한 길이의 트랜스진을 함유하는 렌티바이러스 입자의 특성규명을 제시하는 플롯이다. y-축은 p24의 μg 당 RNA 카피를 제시한다. 바이러스 상층액 ml 당 RNA 카피의 수는 qPCR에 의해 측정된다. 바이러스 상층액 ml 당 p24의 양(μg)은 p24에 대해 ELISA에 의해 측정된다. 2개의 측정된 값의 비율은 p24 질량 당 RNA 카피의 수를 제공한다.

도 3은 K562 세포에 대해 최적화된 조건을 이용하여 GFP mRNA를 이용한 세포의 전기천공 24시간 후에 유세포분석에 의해 측정된 바와 같은 일차 전구세포로부터 배양된 적혈구 세포 및 K562 세포에서의 GFP의 발현을 제시하는 유세포분석 히스토그램을 제시한다.

도 4a, 도 4b, 및 도 4c는 GFP mRNA를 이용한 세포의 전기천공 24시간 후에 유세포분석에 의해 측정된 바와 같은 일차 전구세포로부터 배양된 적혈구 세포에서의 GFP의 발현을 제시하는 유세포분석 히스토그램을 제시한다. 12개의 상이한 조건(번호 1 내지 12)이 제시된다. 첫 번째 열에서, GFP 형광이 검출된다. 두 번째 열에서, Life Technologies LIVE/DEAD 염색으로 세포 생활력이 측정되며, 여기서 사멸된 세포는 염료에 의해 염색되므로, 살아 있는 세포의 백분율은 $100\% - \%$ 형광 세포이다.

도 5는 GFP mRNA를 이용한 세포의 전기천공 24시간 후에 유세포분석에 의해 측정된 바와 같은 분화의 다양한 단계의 일차 전구세포로부터 배양된 적혈구 세포에서의 GFP의 발현을 제시하는 유세포분석 히스토그램을 제시한다. 형질감염되지 않은 세포가 GFP mRNA 형질감염된 세포와 비교된다. 열은 형질감염 전 적혈구 분화 일수를 나타낸다. 생활력 백분율은 Life Technologies LIVE/DEAD 염색으로 측정되며, 살아 있는 세포, 즉, 염색에 대해 음성으로 염색된 세포의 %로 보고된다.

도 6은 GFP mRNA를 이용한 세포의 전기천공 24시간 후에 유세포분석에 의해 측정된 바와 같은 일차 전구세포로부터 배양된 적혈구 세포에서의 GFP의 발현을 제시하는 유세포분석 히스토그램을 제시한다. 세포는 배양 9일째에 형질감염된 후, 분화 배지로 복귀되고, 13일에서 재분석되었다. 13일에, 세포는 GFP mRNA로 재-전기천공되었고, 24시간 후에 발현에 대해 분석되었다.

도 7a, 7b, 및 7c는 시험관 내 분화의 시작 후 상이한 시점에서 전기천공된 GFP 양성 적혈구 세포의 백분율을 제시한다. 도 7a는 확장, 분화, 및 성숙 단계를 예시한다. 도 7b는 성숙 9일을 통해 검정시 분화 9일째의 전기천공 후의 GFP 양성 세포의 백분율을 제시한다. 도 7c는 성숙 16일을 통해 검정시 성숙 7일째의 전기천공 후의 GFP 양성 세포의 백분율을 제시한다. "EP 없음"은 전기천공이 없는 대조군을 나타낸다. "P1-P4"는 4개의 전기천공 조건을 나타낸다.

도 8a 및 8b는 적혈구 세포가 성숙의 M4 내지 M7 일에 GFP를 인코딩하는 mRNA로 전기천공된 경우에 지정된 시점에서 GFP를 발현하는 적혈구 세포에서의 GFP 발현을 제시하는 그래프이다. **도 8a**는 GFP를 발현하는 세포의 백분율을 제시하고, **도 8b**는 세포의 평균 형광 강도를 제시한다.

도 9는 적혈구 세포 성숙의 시간 경과를 제시하는 그래프이다. 원은 AHA 강도/혼입으로 측정된 번역의 수준을 나타낸다. 사각형은 제핵 수준을 나타낸다.

도 10은 적혈구 세포 성숙의 시간 경과를 제시하는 그래프이며, mCherry를 발현하는 세포의 백분율이 y-축에 제시된다. EP, 전기천공된 대조군(RNasin이 없음). UT EP 없음, 형질감염되지 않은 대조군, 전기천공 없음. EP + RNasin 0.5, 0.5 U/ μl RNasin으로 처리된 전기천공된 샘플. EP + RNasin 1, 1 U/ μl RNasin으로 처리된 전기천공된 샘플. EP + RNasin 2, 2 U/ μl RNasin으로 처리된 전기천공된 샘플.

도 11은 상이한 시점에서 프로테아솜 억제제로 처리된 세포의 시간에 비한 유효 발현(평균 형광 강도 \times 형광 세포의 수)/ 1×10^6 을 제시하는 그래프이다.

도 12는 M4일에 GFP-PAL 네이키드 mRNA, GFP-PAL polyA Cap mRNA, GFP-PAL 네이키드 변형 mRNA, 또는 GFP-PAL polyA Cap 변형 mRNA로 전기천공된 세포에 대한 GFP-양성 세포의 백분율을 제시하는 그래프이다. GFP 발현은

M5(24시간 후), M6, M7, 및 M10일에 유세포분석에 의해 측정되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0188] 정의
- [0189] 본원에서 사용되는 용어 "항체 분자"는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하는 단백질, 예를 들어, 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편을 나타낸다. 용어 "항체 분자"는 항체 및 항체 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 항체 분자는 다중특이적 항체 분자, 예를 들어, 이특이적 항체 분자이다. 항체 분자의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, scFv 항체 단편, 이황화물-결합 Fvs(sdFv), VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 예를 들어, sdAb(VL 또는 VH), 카멜리드(camelid) VHH 도메인, 항체 단편, 예를 들어, 힌지 영역에서 이황화물 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체, 항체의 분리된 에피토프 결합 단편, 맥시바디(maxibodies), 미니바디(minibodies), 나노바디(nanobodies), 인트라바디(intrabodies), 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies), 테트라바디(tetrabodies), v-NAR 및 비스-scFv를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0190] 본원에서 사용되는 "분화 조건"은 통상적으로 에리트로포이에틴 및 다른 성장 인자가 첨가되는 생체 외 배양에서 적혈구 전구 세포, 예를 들어, HSC, 또는 CD34+ 세포가 증폭되고 제핵 적혈구 세포(예를 들어, 제핵 망상적혈구 또는 적혈구)로 분화되는 조건이다. 이 과정은 통상적으로 증식/확장 단계, 분화 단계, 및 성숙 단계(그 동안, 세포는 이의 핵을 상실함)를 포함한다. 분화 조건은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Olivier et al., *Novel, High-Yield Red Blood Cell Production Methods from CD34-Positive Cells Derived from Human Embryonic Stem, Yolk Sac, Fetal Liver, Cord Blood, and Peripheral Blood*. *Stem Cells Transl Med*. 2012 Aug; 1(8): 604-614], 및 그 안에 인용된 참고문헌을 참고한다. 본원에서 사용되는 "적혈구 세포"는 적혈구 전구 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포(HSC) 및 유핵 적혈구 전구 세포, 예를 들어, CD34+ 세포, 유핵 적혈구 세포 전구체, 제핵 적혈구 세포(예를 들어, 망상적혈구 또는 적혈구), 및 적혈구 전구 세포와 제핵 적혈구 사이의 임의의 중간물을 포함하는 적혈구 계열의 세포이다. 일 구현예에서, 적혈구 세포는 전적혈모구, 호염기 적혈모구, 다염 적혈모구, 정염 적혈모구, 망상적혈구, 또는 적혈구이다. 일 구현예에서, 적혈구는 제대혈 줄기 세포, CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포(HSC), 비장 콜로니 형성(CFU-S) 세포, 일반 골수성 전구세포(CMP), 배반포 콜로니-형성 세포, 대집락 형성 단위-적혈구(BFU-E), 거핵세포-적혈구 전구세포(MEP) 세포, 적혈구 콜로니-형성 단위(CFU-E), 망상적혈구, 적혈구, 유도 다능성 줄기 세포(iPSC), 중간엽 줄기 세포(MSC), 다염 적혈모구, 정염 적혈모구, 또는 이들의 조합물이다.
- [0191] 구현예들에서, 적혈구 세포는 무한증식 또는 무한증식화 세포이거나, 이들로부터 유래된다. 예를 들어, 무한증식화 적혈모구 세포는 Oct4, Sox2, Klf4, cMyc를 발현하고, TP53를 억제하도록 CD34+ 조혈 전구 세포의 레트로바이러스 형질도입에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Huang et al. (2013) *Mol Ther*, epub ahead of print September 3]에 기재된 바와 같음). 또한, 세포는 자가 사용을 위해 의도될 수 있거나, 동종이형 수혈을 위한 공급원을 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 적혈구 세포는 배양된다.
- [0192] 본원에서 사용되는 "제핵"은 핵이 걸여진 세포, 즉, 성숙 적혈구 세포로의 분화를 통해 핵을 상실한 세포를 나타낸다.
- [0193] "외인성 폴리펩티드"는 상기 유형의 야생형 세포에 의해 생성되지 않거나, 외인성 폴리펩티드를 함유하는 세포에서보다 야생형 세포에서 낮은 수준으로 존재하는 폴리펩티드를 나타낸다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리펩티드는 세포로 도입된 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩티드이며, 상기 핵산은 선택적으로 세포에 의해 보유되지 않는다.
- [0194] 용어 mRNA를 변형시키는데 사용되는 경우의 "외인성"은 mRNA와 선택된 대상 세포, 예를 들어, 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포 사이의 관계를 나타낸다. 외인성 mRNA는 대상 세포에 자연적으로 존재하지 않는다. 일 구현예에서, 외인성 mRNA는 선택된 대상 세포에서 자연 발생하지 않는 폴리펩티드(외인성 폴리펩티드)를 발현한다. 구현예들에서, 외인성 mRNA는 선택된 대상 세포에서 자연 발생하지 않는 제1 부분 및 선택된 대상 세포에서 자연 발생하는 제2 부분을 포함한다.
- [0195] 용어 비번역 영역(UTR)을 변형시키기 위해 사용되는 경우의 "이종성"은 UTR과 UTR이 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역(대상 코딩 영역) 사이의 관계를 나타낸다. UTR은 i) 자연적으로 존재하지 않거나; ii) 대상 코딩 영역과 함께 자연적으로 발생하지 않고, 예를 들어, 대상 코딩 영역과 자연적으로 작동 가능하게 연결되어 발생하는 UTR과 적어도 1개의 뉴클레오티드, 예를 들어, 이의 뉴클레오티드의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 30,

35, 40, 45, 또는 50%만큼 상이하거나; iii) UTR이 대상 코딩 영역과 자연적으로 작동 가능하게 연결되어 발생하지 않지만, 대상 코딩 영역이 아닌 코딩 영역과 자연적으로 작동 가능하게 연결되어 발생하거나, 상기 자연 발생 UTR과 적어도 70, 80, 90, 95, 99, 또는 100% 상동성을 갖는 특성 중 하나 이상을 갖는 경우에 이중성 UTR이다.

[0196] 핵산과 관련하여 본원에서 사용되는 "변형된"은 표준 핵산과 상이한 핵산의 구조적 특징을 나타낸다. 이는 핵산 또는 뉴클레오티드를 제조하는 임의의 특정 과정을 의미하지는 않는다.

[0197] RNA 서열과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "조절 요소"는 분자, 예를 들어, 소분자, RNA 결합 단백질, 또는 조절 RNA, 예를 들어, miRNA의 존재 또는 수준에 반응하여 RNA의 특성(예를 들어, 안정성 또는 번역가능성, 예를 들어, 조절 요소가 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역의 번역 수준)을 조절(예를 들어, 상향조절 또는 하향 조절)할 수 있는 서열을 나타낸다.

[0198] **화학적으로 변형된 핵산**

[0199] 외인성 RNA는 변형되지 않거나 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. 자연 발생 RNA는 4개의 기본 리보뉴클레오티드인 ATP, CTP, UTP 및 GTP로부터 합성되나, 전사후 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 또한, 약 100개의 상이한 뉴클레오티드 변형이 RNA에서 확인되었다(Rozenski, J, Crain, P, and McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. Nucl Acids Res 27: 196-197). RNA는 또한 자연에서 발생하지 않는 전체 합성 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0200] 일부 구현예에서, 화학적 변형은 PCT/US2016/032454호, 미국 특허 공개 번호 20090286852호, 국제 출원 번호 WO/2012/019168호, WO/2012/045075호, WO/2012/135805호, WO/2012/158736호, WO/2013/039857호, WO/2013/039861호, WO/2013/052523호, WO/2013/090648호, WO/2013/096709호, WO/2013/101690호, WO/2013/106496호, WO/2013/130161호, WO/2013/151669호, WO/2013/151736호, WO/2013/151672호, WO/2013/151664호, WO/2013/151665호, WO/2013/151668호, WO/2013/151671호, WO/2013/151667호, WO/2013/151670호, WO/2013/151666호, WO/2013/151663호, WO/2014/028429호, WO/2014/081507호, WO/2014/093924호, WO/2014/093574호, WO/2014/113089호, WO/2014/144711호, WO/2014/144767호, WO/2014/144039호, WO/2014/152540호, WO/2014/152030호, WO/2014/152031호, WO/2014/152027호, WO/2014/152211호, WO/2014/158795호, WO/2014/159813호, WO/2014/164253호, WO/2015/006747호, WO/2015/034928호, WO/2015/034925호, WO/2015/038892호, WO/2015/048744호, WO/2015/051214호, WO/2015/051173호, WO/2015/051169호, WO/2015/058069호, WO/2015/085318호, WO/2015/089511호, WO/2015/105926호, WO/2015/164674호, WO/2015/196130호, WO/2015/196128호, WO/2015/196118호, WO/2016/011226호, WO/2016/011222호, WO/2016/011306호, WO/2016/014846호, WO/2016/022914호, WO/2016/036902호, WO/2016/077125호, WO/2016/077123호에 제공되는 것이며, 상기 특허 출원 각각은 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 폴리뉴클레오티드로의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드의 혼입은 뉴클레오티드 내 변형의 위치에 따라 핵염기, 백본, 또는 핵염기 및 백본 둘 모두에 혼입되는 변형을 발생시킬 수 있음이 이해된다. 일부 구현예에서, 백본 변형은 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 EP 2813570호에 제공된 것이다. 일부 구현예에서, 변형된 캡은 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 공개 번호 20050287539호에 제공된 것이다.

[0201] 일부 구현예에서, 변형된 mRNA는 ARCA: 항-역방향 캡 유사체(m27.3'-OGP3G), GP3G(비메틸화 캡 유사체), m7GP3G(일메틸화 캡 유사체), m32.2.7GP3G(삼메틸화 캡 유사체), m5CTP(5'-메틸-시티딘 트리포스페이트), m6ATP(N6-메틸-아데노신-5'-트리포스페이트), s2UTP(2-티오-우리딘 트리포스페이트), 및 P(슈도우리딘 트리포스페이트) 중 하나 이상을 포함한다. 구현예들에서, 변형된 mRNA는 N6-메틸아데노신을 포함한다. 구현예들에서, 변형된 mRNA는 슈도우리딘을 포함한다.

[0202] 일부 구현예에서, 외인성 RNA는 백본 변형, 예를 들어, 백본 내의 당 또는 포스페이트 기에 대한 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 외인성 RNA는 핵염기 변형을 포함한다.

[0203] 일부 구현예에서, 외인성 mRNA는 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 외인성 mRNA는 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상)의 상이한 유형의 화학적 변형을 포함한다. 예로서, 외인성 mRNA는, 예를 들어, 본원, 예를 들어, 표 1에 기재된 바와 같은 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상)의 상이한 유형의 변형된 핵염기를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 조합하여, 외

인성 mRNA는, 예를 들어, 본원, 예를 들어, 표 2에 기재된 바와 같은 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상)의 상이한 유형의 백본 변형을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 조합하여, 외인성 mRNA는, 예를 들어, 본원, 예를 들어, 표 3에 기재된 바와 같은 2개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상)의 상이한 유형의 변형된 캡을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 외인성 mRNA는 하나 이상의 유형의 변형된 핵염기 및 하나 이상의 유형의 백본 변형; 하나 이상의 유형의 변형된 핵염기 및 하나 이상의 변형된 캡; 하나 이상의 유형의 변형된 캡 및 하나 이상의 유형의 백본 변형; 또는 하나 이상의 유형의 변형된 핵염기, 하나 이상의 유형의 백본 변형, 및 하나 이상의 유형의 변형된 캡을 포함한다.

[0204] 일부 구현예에서, 외인성 mRNA는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 이상)의 변형된 핵염기를 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA의 모든 핵염기는 변형된다. 일부 구현예에서, 외인성 mRNA는 백본 내의 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 이상)의 위치에서 변형된다. 일부 구현예에서, mRNA의 모든 백본 위치는 변형된다.

[0205] **이종성 비번역 영역**

[0206] 본원에 기재된 외인성 mRNA는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4개 이상)의 이종성 UTR을 포함할 수 있다. UTR은, 예를 들어, 3' UTR 또는 5' UTR일 수 있다. 구현예들에서, 이종성 UTR은 진핵생물, 예를 들어, 동물, 예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 인간 UTR 서열, 또는 이 중 임의의 것의 일부 또는 변이체를 포함한다. 구현예들에서, 이종성 UTR은 합성 서열을 포함한다. 구현예들에서, 이종성 UTR은 바이러스 UTR, 예를 들어, 간염 바이러스 UTR, 예를 들어, 우드척(Woodchuck) 간염 바이러스 UTR 이외의 것이다.

[0207] 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 일부 구현예에서, 5' UTR은 번역 동안 리보솜의 스캐닝 시간을 감소시키기 위해 짧다. 구현예들에서, 비번역 영역은 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 또는 5개 미만의 뉴클레오티드 길이이다. 구현예들에서, 5' UTR은 자연 발생 5' UTR로부터의 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 또는 5개 이하의 연속적인 뉴클레오티드를 갖는 서열을 포함한다. 구현예들에서, UTR은 5' UTR이 결여되어 있다.

[0208] 일부 구현예에서, 5' UTR은 시작 코돈의 AUG 업스트림(uAUG)을 포함하지 않는다. 본원의 비제한적인 이론에 따르면, 일부 자연 발생 5' UTR은 인코딩되는 유전자의 번역을 조절, 예를 들어, 감소시킬 수 있는 하나 이상의 uAUG를 함유한다. 때때로, uAUG는 정지 코돈과 쌍을 이루어 uORF를 형성한다. 따라서, 일부 구현예에서, 5' UTR은 자연 발생 5' UTR과 서열 유사성을 가지나, 자연 발생 5' UTR에 비해 하나 이상의 uAUG 또는 uORF가 결여되어 있다. 하나 이상의 uAUG는, 예를 들어, 결실 또는 치환 돌연변이에 의해 제거될 수 있다.

[0209] 본원에 제공된 이종성 UTR이, 예를 들어, 이종성 UTR을 포함하는 mRNA와 적혈구 세포를 접촉시킴으로써 정제된 RNA의 일부로서 제공될 수 있음이 이해된다. 본원의 이종성 UTR은 또한, 예를 들어, 세포가 DNA를 이종성 UTR을 포함하는 RNA로 전사하는 것을 가능하게 하는 조건하에서 DNA와 적혈구 세포를 접촉시킴으로써 DNA를 통해 제공될 수 있다.

[0210] 구현예들에서, 3' UTR은 polyA 꼬리, 예를 들어, 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 아데노신을 포함한다.

[0211] 구현예들에서, 외인성 RNA는 직접적 또는 간접적인 업스트림 요소의 다운스트림 요소로의 결합을 통해 RNA의 고리화를 가능하게 하는 5' UTR 및 3' UTR을 포함한다. 구현예들에서, 외인성 RNA는 고리화에 관여하는 5' 캡을 포함한다.

[0212] **조절 요소를 포함하는 UTR**

[0213] 구현예들에서, UTR은 조절 요소를 포함한다. 조절 요소는 작동 가능하게 연결된 코딩 영역의 특성(예를 들어, 안정성 또는 번역 수준)을 조절(예를 들어, 상향조절 또는 하향조절)할 수 있다. 일부 구현예에서, 조절 요소는 RNA의 번역 시기를 제어한다. 예를 들어, RNA는 세포 주기의 단계, 병원체(예를 들어, 세포로 진입하는 바이러스)의 존재 또는 수준, 적혈구 세포 분화의 단계, 세포 내부의 분자(예를 들어, 대사물, 신호전달 분자, 또는 RNA, 예를 들어, miRNA)의 존재 또는 수준, 또는 세포 외부의 분자(예를 들어, 적혈구 세포의 표면 상의 수용체에 의해 결합되는 단백질)의 존재 또는 수준에 반응하여 번역될 수 있다.

[0214] 구현예들에서, 조절 요소는, 예를 들어, 문헌[Callura et al., "Tracking, tuning, and terminating microbial

physiology using synthetic riboregulators" PNAS 107:36, p.15898-15903]에 기재된 바와 같이 리보조절인자(riboregulator)를 포함한다. 구현예들에서, 리보조절인자는 리보솜 결합 부위를 은폐하여 mRNA의 번역을 억제하는 헤어핀을 포함한다. 구현예들에서, 전이-활성화 RNA(trans-activating RNA)는 헤어핀에 결합하고 이를 개방시켜, 리보솜 결합 부위를 노출시키고, mRNA가 번역되도록 한다. 구현예들에서, 리보솜 결합 부위는 IRES, 예를 들어, 문헌[Pedersen, SK, et al., Biochem J. 2002 Apr 1; 363(Pt 1): 37-44]에 기재된 인간 IGF-II 5' UTR-유래 IRES이다:

GACCGGG CATTGCCCC AGTCTCCCC AAATTGGGC ATTGTCCCCG
GGTCTTCAA CGACTGGGC GTTGCTCCCG GACTGAGG ACTGGCCCCG
GGGTCTCGCT CACCTTCAGC AG (SEQ ID NO: 2)

[0215]

구현예들에서, 조절 요소는, 예를 들어, 국제 출원 W02012058488호에 기재된 바와 같은 토홀드 스위치(toehold switch)를 포함한다. 구현예들에서, 토홀드는 리보조절인자와 유사하게 기능하며, 전이-조절 RNA와 상동성을 갖는 토홀드로 언급되는 짧은 단일 가닥 서열을 추가로 포함한다. 구현예들에서, 토홀드는 상이한 결합 파트너를 샘플링할 수 있으며, 이에 의해 전이-조절 RNA가 존재하는지의 여부를 더욱 신속히 검출할 수 있다.

[0216]

[0217]

구현예들에서, 조절 요소는 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Araujo et al., "Before It Gets Started: Regulating Translation at the 5' UTR" Comparative and Functional Genomics, Volume 2012 (2012), Article ID 475731, 8 pages]에 기재된 것이다.

[0218]

구현예들에서, 조절 요소는 업스트림 오픈 리딩 프레임(uORF)을 포함한다. uORF는 uAUG 및 uAUG와 인-프레임(in-frame)의 정지 코돈을 포함한다. uORF는 리보솜이 uORF를 번역한 후, 다운스트림 코딩 영역에 도달하지 않고 정지 코돈에서 정지하는 경우에 종종 번역의 음성 조절인자로 작용한다. 예시적인 uORF는 아르기닌 농도에 의해 조절되는 진균 아르기닌 감쇠자 펩티드(AAP)에서 발견되는 것이다. 또 다른 예시적 uORF는 효모 GCN4에서 발견되며, 여기서 번역은 아미노산 고갈 조건하에서 활성화된다. 또 다른 uORF는 카르니틴 팔미토일트랜스퍼라제 1C(CPT1C) mRNA에서 발견되며, 여기서 억제는 글루코스 결핍에 반응하여 완화된다. 일부 구현예에서, uORF는 합성 uORF이다. 일부 구현예에서, uORF는 사이클린-의존성-키나제 억제제 단백질(CDKN2A), 트롬보포이에틴, 헤어리스(hairless) 동족체, TGF-beta3, SRY, IRF6, PRKAR1A, SPINK1, 또는 HBB에 대한 mRNA의 5' UTR에서 발견되는 것이다.

[0219]

구현예들에서, 조절 요소는 이차 구조, 예를 들어, 헤어핀을 포함한다. 구현예들에서, 헤어핀은 약 -30, -40, -50, -60, -70, -80, -90, 또는 -100 kcal/mol 또는 더 강한 자유 에너지를 가지며, 이는 헤어핀이 결합된 mRNA에 비해 mRNA의 번역을 감소시키기에 충분하다. 구현예들에서, 이차 구조는 YB-1에 결합하는 TGF-beta1 mRNA, 또는 이의 단편 또는 변이체에서 발견되는 것이다.

[0220]

구현예들에서, 조절 요소는 RPB(RNA-결합 단백질) 결합 모티프를 포함한다. 구현예들에서, RNA 결합 단백질은 HuR, Musashi, IRP(예를 들어, IRP1 또는 IRP2), SXL, 또는 lin-14를 포함한다. 구현예들에서, 조절 요소는 IRE, SXL 결합 모티프, p21 5' UTR GC-풍부 스템 루프, 또는 lin-4 모티프를 포함한다. IRP1 및 IRP2는 철-반응 요소(IRE)로 언급되는 스템-루프 서열에 결합하며; 결합은 번역에 대한 입체적 블록을 생성시킨다. SXL 단백질은 SXL 결합 모티프, 예를 들어, 5' UTR 내의 인트론 내의 poly-U 스트레치에 결합하여 인트론 유지를 야기시킨다. SXL 단백질은 또한 3' UTR 내의 poly-U 영역에 결합하여 예비-개시 복합체의 모집을 차단하고, 번역을 억제한다. SXL은 또한 uORF의 번역을 촉진하여, 주요 코딩 영역의 번역을 억제한다. p21 5' UTR GC-풍부 스템 루프는 CUGBP1(번역 활성화인자) 또는 칼레티쿨린(CRT, 번역 억제인자)에 의해 결합된다.

[0221]

일부 구현예에서, 조절 요소는 전이-작용 RNA에 대한 결합 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 전이-작용 RNA는 miRNA이다. 구현예들에서, 비번역 영역은 RNA-결합 서열, 예를 들어, lin-4 RNA에 의해 결합되는 보존 서열을 포함하는 lin-14 3' UTR을 포함하여 lin-14 RNA의 번역을 하향 조절한다(Wightman et al., Cell, Vol. 75, 855-862, December 3, 1993).

[0222]

구현예들에서, 조절 요소는 리보솜 RNA에 결합하고, 예를 들어, 5' UTR의 세그먼트를 우회하여 시작 코돈에 도달하도록 하는 리보솜의 션팅(shunting)을 촉진하는 서열을 포함한다. 구현예들에서, 션팅을 촉진하는 조절 서열은 꽃양배추 모자이크 바이러스 또는 아데노바이러스에서 발견되는 서열이다.

[0223]

적혈구 세포 단백질의 UTR

[0224]

일부 구현예에서, 비번역 영역은 야생형 적혈구 세포, 예를 들어, 성숙 적혈구 세포에서 발현되는 RNA의 UTR이

다. 구현예들에서, UTR은 타입 I 적혈구 세포 막횡단 단백질(예를 들어, 글리코포린 A), 타입 II 적혈구 세포 막횡단 단백질(예를 들어, Ke11 또는 CD71), 또는 타입 III 적혈구 세포 막횡단 단백질, 예를 들어, GLUT1에 대한 유전자의 UTR이다. 구현예들에서, UTR은 적혈구 세포 단백질, 예를 들어, CD235a, c-Kit, GPA, IL3R, CD34, CD36, CD71, Band 3, 헤모글로빈, 및 Alpha 4 인테그린의 UTR이다. 구현예들에서, UTR은 스펙트린, 양키린, 4.1R, 4.2, p55, 트로포모듈린(tropomodulin), 또는 4.9에 대한 유전자의 UTR이다.

[0225] 일부 구현예에서, 비번역 영역은 헤모글로빈 UTR, 예를 들어, SEQ ID NO:1의 3' 헤모글로빈 UTR을 포함한다:

```
GCTCGCTTTCTTGTCTGCAATTTCTATTAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAAC
ACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAA
ACATTTATTTTCATTC.
```

[0226]

구현예들에서, 비번역 영역은 SEQ ID NO:1의 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 또는 130개의 뉴클레오티드의 스트레치를 포함한다. 구현예들에서, 비번역 영역은 SEQ ID NO:1의 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0228] 일부 구현예에서, 외인성 mRNA는 이중성 3' UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, 외인성 mRNA는 이중성 5' UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, 외인성 mRNA는 이중성 3' UTR 및 이중성 5' UTR을 포함한다.

[0229] **조절 RNA**

[0230] 본 발명은, 일부 양태에서, 조절 RNA를 포함하는 적혈구 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 외인성 mRNA를 추가로 포함한다.

[0231] 관련 양태에서, 본 발명은 적혈구 세포와 조절 RNA를 접촉시키는 방법을 포함한다. 구현예들에서, 상기 방법은 세포와 외인성 mRNA를 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 구현예들에서, 세포는 조절 RNA와의 접촉 전, 접촉 동안, 또는 접촉 후에 외인성 mRNA와 접촉된다.

[0232] 관련 양태에서, 본 발명은 (i) 조절 RNA(예를 들어, miRNA 또는 항-miR), 및 (ii) 본원에 기재된 외인성 mRNA, 예를 들어, 인간 세포(예를 들어, 인간 적혈구 세포)에서의 발현에 대해 코돈-최적화된 mRNA, 적혈구 세포 막횡단 세그먼트를 포함하는 mRNA, 또는 본원에 기재된 이중성 UTR(예를 들어, 헤모글로빈 UTR 또는 또 다른 적혈구 세포 단백질로부터의 UTR)을 포함하는 mRNA를 포함하는 조성물(예를 들어, 정제되거나 분리된 조성물)을 포함한다.

[0233] 구현예들에서, 조절 RNA는 외인성 mRNA의 특성(예를 들어, 안정성 또는 번역)을 조절한다. 일부 구현예에서, 조절 RNA는 적혈구 세포에 영향을 미치고, 예를 들어, 이의 증식 또는 분화에 영향을 미친다. 일부 구현예에서, 증식에 영향을 미치는 것은 시작 세포(예를 들어, 배양 중)가 이루는 분열의 수를 증가시키고/시키거나, 시작 세포 또는 집단으로부터 생성되는 세포의 전체 수를 증가시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 분화를 조절하는 것은 성숙 및/또는 제핵을 촉진하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 조절 RNA는 EPO를 인코딩하며, 예를 들어, 적혈구 세포의 확장을 자극한다.

[0234] 구현예들에서, 조절 RNA는 miRNA이다. 일부 구현예에서, miRNA는 인간 miRNA, 예를 들어, 본원의 표 12에 열거된 miRNA, 예를 들어, "MIR"로 시작하는 표기가 있는 표 12의 요소 중 하나, 또는 이에 대한 1, 2, 3, 4, 또는 5개 이하의 변경(예를 들어, 치환, 삽입, 또는 결실)을 갖는 서열이다.

[0235] 일부 구현예에서, 조절 RNA는 항-miR이다. 일부 구현예에서, 항-miR은 miRNA와 하이브리드화되고, miRNA가 이의 표적 mRNA와 결합하는 것을 방지함으로써 miRNA(예를 들어, 내인성 miRNA)를 억제한다. 일부 구현예에서, 항-miR은 인간 miRNA, 예를 들어, 본원의 표 12에 열거된 miRNA, 예를 들어, "MIR"로 시작하는 표기가 있는 표 12의 요소 중 하나, 또는 이에 대한 1, 2, 3, 4, 또는 5개 이하의 변경(예를 들어, 치환, 삽입, 또는 결실)을 갖는 서열에 결합하고/하거나 이에 대한 상보성을 갖는다.

[0236] 일부 구현예에서, 조절 RNA는 siRNA, shRNA, 또는 안티센스 분자이다. 구현예들에서, siRNA는 서로 하이브리드화될 수 있는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하며, 여기서 안티센스 가닥은 표적 mRNA에 추가로 하이브리드화될 수 있고; 1개 또는 2개의 불런트 말단을 가질 수 있고; 1개 또는 2개의 오버행, 예를 들어, 3' dTdT 오버행을 가질 수 있고; 화학적 변형을 포함할 수 있고; 캡을 포함할 수 있고; 컨쥬게이트를 포함할 수 있다. 구현예들에서, shRNA는 센스 영역, 안티센스 영역, 및 루프 영역을 갖는 헤어핀 구조를 포함하며, 여기서 센스 영역 및 안티센스 영역은 서로 하이브리드화될 수 있고, 안티센스 영역은 표적 mRNA에 추가로 하이브리드화될 수 있고; 불런트 말단을 가질 수 있고; 오버행을 가질 수 있고; 화학적 변형을 포함할 수 있고; 캡을 포함할 수

있고; 컨쥬게이트를 포함할 수 있다. 구현예들에서, 안티센스 분자는 표적 mRNA에 하이브리드화될 수 있는 단일 가닥을 포함하고; 화학적 변형을 포함할 수 있고; 캡을 포함할 수 있고; 컨쥬게이트를 포함할 수 있다.

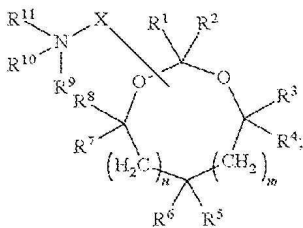
[0237] **지질 나노입자 방법**

[0238] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 RNA(예를 들어, mRNA)는 지질 나노입자(LNP)를 이용하여, 예를 들어, 형질감염에 의해 적혈구 세포로 도입된다. 따라서, 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 적혈구 세포와 mRNA 및 LNP, 예를 들어, 본원에 기재된 LNP를 접촉시키는 단계를 포함하는 적혈구 세포로 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 도입하는 방법을 제공한다. 본 발명의 개시는 또한 적혈구 세포, mRNA, 및 LNP를 포함하는 반응 혼합물을 제공한다. 일부 구현예에서, mRNA는 LNP와 복합체화된다. 구현예들에서, LNP와 접촉되는 세포의 집단은 적어도 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 또는 5×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 또는 5×10^{10} 개의 세포를 포함한다.

[0239] 예시적 LNP는 양이온성 트리알킬 지질, 비-양이온성 지질(예를 들어, PEG-지질 컨쥬게이트 및 인지질), 및 지질 입자 내에서 캡슐화된 mRNA 분자를 포함한다. 구현예들에서, 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 구현예들에서, PEG-지질 컨쥬게이트는 PEG-디아실글리세롤(PEG-DAG) 컨쥬게이트, PEG-디아실옥시프로필(PEG-DAA) 컨쥬게이트, PEG-인지질 컨쥬게이트, PEG-세라미드(PEG-Cer) 컨쥬게이트, 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된다. 구현예들에서, PEG-DAA 컨쥬게이트는 PEG-디테실옥시프로필(C_{10}) 컨쥬게이트, PEG-디라우릴옥시프로필(C_{12}) 컨쥬게이트, PEG-디미리스틸옥시프로필(C_{14}) 컨쥬게이트, PEG-디팔미틸옥시프로필(C_{16}) 컨쥬게이트, PEG-디스테아릴옥시프로필(C_{18}) 컨쥬게이트, 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된다. 구현예들에서, LNP는 콜레스테롤을 추가로 포함한다. 추가의 LNP는, 예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 공개 번호 20160256567호에 기재되어 있다.

[0240] 또 다른 예시적 LNP는 하기 구조 화학식 (I)를 갖는 지질 또는 이의 염을 포함할 수 있다:

[0241] [구조 화학식 I]



[0242]

[0243] 상기 식에서,

[0244] R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , 및 R^8 은 수소, 선택적으로 치환되는 C_7 - C_{30} 알킬, 선택적으로 치환되는 C_7 - C_{30} 알케닐 및 선택적으로 치환되는 C_7 - C_{30} 알키닐로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되고;

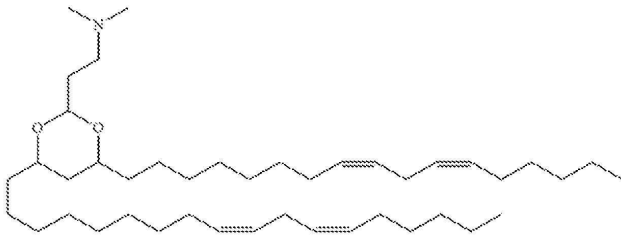
[0245] 단, (a) R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , 및 R^8 중 적어도 2개는 수소가 아니고, (b) 수소가 아닌 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , 및 R^8 중 적어도 2개 중 2개는 서로에 대해 1,3 배열, 1,4 배열 또는 1,5 배열로 존재하고;

[0246] X는 C_1 - C_6 알킬, C_2 - C_6 알케닐 및 C_2 - C_6 알키닐로 구성된 군으로부터 선택되고;

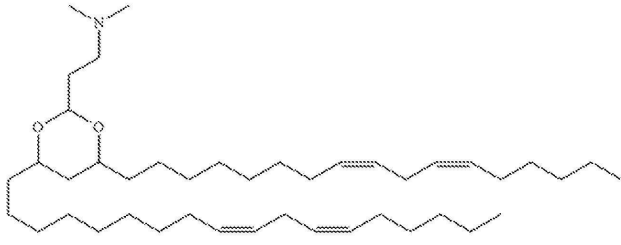
[0247] R^9 , R^{10} , 및 R^{11} 은 독립적으로 수소, 선택적으로 치환되는 C_1 - C_7 알킬, 선택적으로 치환되는 C_2 - C_7 알케닐 및 선택적으로 치환되는 C_2 - C_7 알키닐로 구성된 군으로부터 선택되나, 단, R^9 , R^{10} , 및 R^{11} 중 하나는 부재할 수 있고;

[0248] n 및 m은 각각 독립적으로 0 또는 1이다.

[0249] 예를 들어, 지질은 하기 구조 중 하나를 포함할 수 있다:

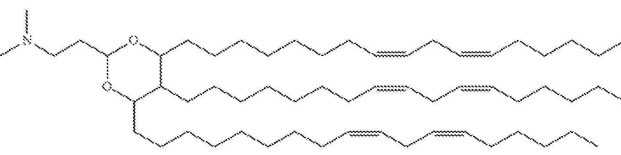


[0250]



[0251]

, 또는



[0252]

[0253]

구현예들에서, LNP는 비-양이온성 지질, 예를 들어, 인지질, 콜레스테롤, 또는 인지질 및 콜레스테롤의 혼합물을 추가로 포함한다. 구현예들에서, 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 추가의 LNP는, 예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 공개 번호 20130064894호에 기재되어 있다.

[0254]

또 다른 예시적 LNP는 (a) 핵산, 예를 들어, mRNA; (b) 입자 내에 존재하는 전체 지질의 50 mol% 내지 65 mol%(예를 들어, 52 mol% 내지 62 mol%)를 구성하는 양이온성 지질; (c) 인지질 및 콜레스테롤 또는 이의 유도체의 혼합물을 포함하는 비-양이온성 지질로서, 인지질이 입자에 존재하는 전체 지질의 4 mol% 내지 10 mol%를 구성하고, 콜레스테롤 또는 이의 유도체가 입자에 존재하는 전체 지질의 30 mol% 내지 40 mol%를 구성하는, 비-양이온성 지질; 및 (d) 입자에 존재하는 전체 지질의 0.5 mol% 내지 2 mol%를 구성하는 입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질을 포함한다. 구현예들에서, 인지질은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 구현예들에서, 입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이션된 지질은 폴리에틸렌글리콜(PEG)-지질 컨쥬게이트를 포함한다. 구현예들에서, PEG-지질 컨쥬게이트는 PEG-디아실글리세롤(PEG-DAG) 컨쥬게이트, PEG-디아킬옥시프로필(PEG-DAA) 컨쥬게이트, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 구현예들에서, PEG-DAA 컨쥬게이트는 PEG-디미리스틸옥시프로필(PEG-DMA) 컨쥬게이트, PEG-디스테아릴옥시프로필(PEG-DSA) 컨쥬게이트, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 추가의 LNP는, 예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 8,058,069호에 기재되어 있다.

[0255]

적혈구 세포를 제조하는 방법

[0256]

적혈구 전구 세포를 성숙 적혈구 세포로 분화시키는 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[*Douay & Andreu. Transfus Med Rev. 2007 Apr;21(2):91-100; Giarratana et al. Nat Biotechnol. 2005 Jan;23(1):69-74; Olivier et al. Stem Cells Transl Med. 2012 Aug; 1(8): 604-614*] 및 이에 인용된 참고문헌을 참조한다.

[0257]

외인성 RNA 및/또는 단백질을 포함(예를 들어, 발현)하는 적혈구 세포를 제조하는 방법은, 예를 들어, WO2015/073587호 및 WO2015/153102호에 기재되어 있으며, 이들 각각의 전체내용은 참조로서 포함된다.

[0258]

일부 구현예에서, 조혈 전구 세포, 예를 들어, CD34+ 조혈 전구 세포는 하나 이상의 외인성 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 또는 핵산들과 접촉되며, 세포는 배양시 확장되고 분화된다.

[0259]

구현예들에서, 상기 방법은, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 세포를 전기천공하는 단계를 포함한다.

[0260]

일부 구현예에서, 적혈구 세포는 적어도 1000, 2000, 5000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000배(선택적으로, 100,000, 200,000, 또는 500,000배 이하) 확장된다. 세포의 수는, 일부 구현예에서, 자동화 세포 계수기를

이용하여 측정된다.

[0261] 일부 구현예에서, 적혈구 세포의 집단은 적어도 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 98%(선택적으로, 약 80, 90, 또는 100% 이하)의 제핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 적혈구 세포의 집단은 1% 미만의 살아 있는 제핵 세포를 함유하고, 예를 들어, 검출 가능하지 않은 살아 있는 제핵 세포를 함유한다. 제핵은, 일부 구현예에서, 핵 염색을 이용한 FACS에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 집단 내의 적혈구 세포의 적어도 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80%(선택적으로, 약 70, 80, 90, 또는 100% 이하)는 외인성 RNA 및/또는 폴리펩티드를 포함한다. 외인성 폴리펩티드의 발현은, 일부 구현예에서, 폴리펩티드에 대한 표지된 항체를 이용한 FACS에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 제핵 세포의 집단은 약 1×10^9 내지 2×10^9 , 2×10^9 내지 5×10^9 , 5×10^9 내지 1×10^{10} , 1×10^{10} 내지 2×10^{10} , 2×10^{10} 내지 5×10^{10} , 5×10^{10} 내지 1×10^{11} , 1×10^{11} 내지 2×10^{11} , 2×10^{11} 내지 5×10^{11} , 5×10^{11} 내지 1×10^{12} , 1×10^{12} 내지 2×10^{12} , 2×10^{12} 내지 5×10^{12} , 또는 5×10^{12} 내지 1×10^{13} 개의 세포를 포함한다.

[0262] **예시적인 외인성 폴리펩티드 및 이의 용도**

[0263] 외인성 단백질 중 하나 이상은 진핵생물 세포, 예를 들어, 포유동물 세포, 예를 들어, 인간 세포에서 특징적인 번역후 변형을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 단백질 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 이상)은 당화되거나, 인산화되거나, 당화 및 인산화된다. 당단백질의 시판된 내 검출은 과요오드산-쉬프(Periodic acid-Schiff)(PAS) 방법의 변형을 이용하여 SDS-PAGE 젤 및 웨스턴 블롯에서 일상적으로 달성된다. 당단백질의 세포 국소화는 당 분야에 공지된 렉틴 형광 컨주게이트를 이용하여 달성될 수 있다. 인산화는 포스포-특이적 항체를 이용하여 웨스턴 블롯에 의해 평가될 수 있다.

[0264] 번역 후 변형은 또한 소수성 기에 대한 컨주게이션(예를 들어, 미리스토일화, 팔미토일화, 이소프레닐화, 프레닐화, 또는 글리피화), 보조인자에 대한 컨주게이션(예를 들어, 리포일화(lipoylation), 플라빈 모이어티(예를 들어, FMN 또는 FAD), 헴 C 부착, 포스포판테테이닐화(phosphopantetheinylation), 또는 레티닐리덴 쉬프 염기 형성), 디프타미드 형성, 에탄올아민 포스포글리세롤 부착, 하이푸신(hypusine) 형성, 아실화(예를 들어, O-아실화, N-아실화, 또는 S-아실화), 포르밀화, 아세틸화, 알킬화(예를 들어, 메틸화 또는 에틸화), 아미드화, 부티릴화, 감마-카르복실화, 말로닐화, 하이드록실화, 요오드화, 뉴클레오티드 첨가, 예를 들어, ADP-리보실화, 산화, 포스페이트 에스테르(O-결합) 또는 포스포르아미데이트(N-결합) 형성(예를 들어, 인산화 또는 아데닐릴화), 프로피오닐화, 피로글루타메이트 형성, S-글루타티오닐화, S-니트로실화, 숙시닐화, 황산화, ISG화(ISGylation), 수모화(SUMOylation), 유비퀴틴화, 네딜화(Neddylatation), 또는 아미노산의 화학적 변형(예를 들어, 시트룰린화, 탈아미드화, 엘리미니이션(eliminylatation), 또는 카르바미드화), 이황화 브릿지의 형성, 라세미화(예를 들어, 프롤린, 세린, 알라닌, 또는 메티오닌의 라세미화)를 포함한다. 구현예들에서, 당화는 당화를 발생시키는 아르기닌, 아스파라긴, 시스테인, 하이드록시리신, 세린, 트레오닌, 티로신, 또는 트립토판으로의 글리코실기의 첨가를 포함한다. 구현예들에서, 당화는, 예를 들어, O-결합 당화 또는 N-결합 당화를 포함한다.

[0265] 일부 구현예에서, 외인성 폴리펩티드 중 하나 이상은 융합 단백질, 예를 들어, 내인성 적혈구 세포 단백질 또는 이의 단편, 예를 들어, 막횡단 단백질, 예를 들어, 이의 GPA 또는 막횡단 단편과의 융합체이다.

[0266] 일부 구현예에서, 외인성 폴리펩티드에 대한 코딩 영역은 발현되는 세포, 예를 들어, 포유동물 적혈구 세포, 예를 들어, 인간 적혈구 세포에 대해 코돈-최적화된다.

[0267] 일부 구현예에서, 적혈구 세포는 세포 당 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개 카피의 외인성 단백질을 포함한다. 구현예들에서, 외인성 단백질의 카피수는, 예를 들어, 정량적 웨스턴 블롯에 의하거나, 유세포분석 검정에서 표준화된 형광 미세구(예를 들어, Bangs Laboratories로부터의 것)를 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 외인성 단백질이 형광 단백질인 경우, 평균 형광 강도(MFI)는, 예를 들어, 샘플의 MFI를 결정하고, 유사한 샘플에서 형광 단백질의 카피수를 정량하고(예를 들어, 정량적 웨스턴 블롯에 의함), MFI와 단백질 카피수 사이의 전환 인자를 계산함으로써 단백질 카피수를 추정하기 위해 사용될 수 있다.

[0268] **제핵 적혈구 세포의 물리적 특징**

[0269] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 적혈구 세포는 본원에 기재된 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4개 이상)의 물리적 특징, 예를 들어, 삼투 취약성, 세포 크기, 헤모글로빈 농도, 또는 포스파티딜세린 함량을 갖는다. 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 일부 구현예에서, 외인성 단백질을 발현하는 제핵 적혈구 세포는 야생형의 미처

리 적혈구 세포(예를 들어, 저장성 투석에 적용되지 않은 적혈구 세포)와 유사한 물리적 특징을 갖는다. 대조적으로, 저장성으로 로딩된 RBC는 때때로 변경된 물리적 특징, 예를 들어, 증가된 삼투 취약성, 변경된 세포 크기, 감소된 헤모글로빈 농도, 또는 세포막의 외엽 상에서의 증가된 포스파티딜세린 수준을 나타낸다.

[0270] 삼투 취약성

[0271] 일부 구현예에서, 제핵 적혈구 세포는 외인성 폴리펩티드를 포함하지 않는 분리된 배양되지 않은 적혈구 세포와 실질적으로 동일한 삼투막 취약성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 제핵 적혈구 세포의 집단은 0.3%, 0.35%, 0.4%, 0.45%, 또는 0.5% NaCl에서 50% 미만의 세포 용해의 삼투 취약성을 갖는다. 일부 구현예에서, 제핵 적혈구 세포의 집단은 물 중 0.3%, 0.35%, 0.4%, 0.45%, 또는 0.5% NaCl로 구성된 용액에서 50% 미만의 세포 용해의 삼투 취약성을 갖는다. 삼투 취약성은, 일부 구현예에서, W02015/073587호의 실시예 59의 방법을 이용하여 결정된다.

[0272] 세포 크기

[0273] 일부 구현예에서, 제핵 적혈구 세포는 야생형의 미처리 망상적혈구와 대략적인 직경 또는 용적을 갖는다. 일부 구현예에서, 제핵 적혈구 세포는 약 150 fl, 예를 들어, 약 140 내지 160, 130 내지 170, 또는 120 내지 180 fl의 용적을 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 약 150 fl, 약 140 내지 160, 130 내지 170, 120 내지 180, 110 내지 190, 또는 100 내지 200 fl의 평균 세포 용적을 갖는다. 일부 구현예에서, 집단 내의 세포의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%는 약 140 내지 160, 130 내지 170, 120 내지 180, 110 내지 190, 또는 100 내지 200 fl의 용적을 갖는다. 일부 구현예에서, 적혈구 세포의 평균 적혈구 용적의 용적은 10 fl, 20 fl, 30 fl, 40 fl, 50 fl, 60 fl, 70 fl, 80 fl, 90 fl, 100 fl, 110 fl, 120 fl, 130 fl, 140 fl, 150 fl 초과, 또는 150 fl 초과이다. 일 구현예에서, 적혈구 세포의 평균 적혈구 용적은 30 fl, 40 fl, 50 fl, 60 fl, 70 fl, 80 fl, 90 fl, 100 fl, 110 fl, 120 fl, 130 fl, 140 fl, 150 fl, 160 fl, 170 fl, 180 fl, 190 fl, 200 fl 미만, 또는 200 fl 미만이다. 일 구현예에서, 적혈구 세포의 평균 적혈구 용적은 80 내지 100, 100 내지 200, 200 내지 300, 300 내지 400, 또는 400 내지 500 펠토리터(fl)이다. 일부 구현예에서, 적혈구 세포의 집단은 본 단락에 기재된 평균 적혈구 용적을 가지며, 집단의 표준 편차는 50, 40, 30, 20, 10, 5, 또는 2 fl 미만이다. 용적은, 일부 구현예에서, 혈액학적 분석 장치, 예를 들어, 쿨터 계수기(Coulter Counter)를 이용하여 측정된다.

[0274] 헤모글로빈 농도

[0275] 일부 구현예에서, 제핵 적혈구 세포는 야생형의 미처리 적혈구 세포, 예를 들어, 성숙 RBC와 유사한 헤모글로빈 함량을 갖는다. 일부 구현예에서, 적혈구 세포는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 초과 또는 10% 초과에 이르는 헤모글로빈을 포함한다. 일부 구현예에서, 적혈구 세포는 적어도 약 20, 22, 24, 26, 28, 또는 30 pg, 선택적으로 약 30 pg 이하의 전체 헤모글로빈을 포함한다. 헤모글로빈 수준은, 일부 구현예에서, W02015/073587호의 실시예 33의 드랍킨 시약(Drabkin's reagent) 방법을 이용하여 결정된다.

[0276] 포스파티딜세린 함량

[0277] 일부 구현예에서, 제핵 적혈구 세포는 야생형의 미처리 RBC와 대략적으로 동일한 세포막의 외엽 상의 포스파티딜세린 함량을 갖는다. 포스파티딜세린은 주로 야생형의 미처리 RBC의 세포막의 내엽에 존재하며, 저장성 로딩은 포스파티딜세린이 외엽에 분포하도록 할 수 있으며, 여기서 이는 면역 반응을 촉발시킬 수 있다. 일부 구현예에서, RBC의 집단은 Annexin V 염색에 대해 양성인 약 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1% 미만의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내의 제핵 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 외인성 단백질을 발현하지 않는 달리 유사하게 배양된 적혈구 세포와 동일한 수준의 포스파티딜세린 노출을 갖는다. 포스파티딜세린 노출은, 일부 구현예에서, 예를 들어, W02015/073587호의 실시예 54의 방법을 이용하여 PS에 우선적으로 결합하는 Annexin-V-FITC에 대한 염색 및 유세포분석에 의한 FITC 형광 측정에 의해 평가된다.

[0278] 다른 특징

[0279] 일부 구현예에서, 적혈구 세포의 집단은 GPA에 대해 양성인 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%(선택적으로, 90 또는 100% 이하)의 세포를 포함한다. GPA의 존재는, 일부 구현예에서, FACS를 이용하여 검출된다.

[0280] 일부 구현예에서, 적혈구 세포는 대상체에서 적어도 30, 45, 또는 90일의 반감기를 갖는다.

- [0281] *적혈구 세포 분화 및 성숙의 단계*
- [0282] 구현예들에서, 제핵 적혈구 세포는 CD34+ 줄기 세포를 첫 번째 확장, 이후 분화, 및 최종적으로 성숙 조건의 3개의 조건에 노출시킴으로써 생성된다. 예시적인 확장, 분화, 및 성숙 조건은, 예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 W02015/073587호의 단락 [1221]의 실시예 3의 단계 1, 2, 및 3으로 기재되어 있다. 구현예들에서, 확장 단계는 확장 배지(예를 들어, 상기 단계 1의 배지)에서 세포를 배양하는 것을 포함하고, 분화 단계는 분화 배지(예를 들어, 상기 단계 2의 배지)에서 세포를 배양하는 것을 포함하고, 성숙 단계는 성숙 배지(예를 들어, 상기 단계 3의 배지)에서 세포를 배양하는 것을 포함한다.
- [0283] 구현예들에서, 성숙 단계는, 예를 들어, 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 약 84%가 GPA에 대해 양성인 경우에 시작된다. 구현예들에서, 성숙 단계의 시작시, 세포의 집단은, 예를 들어, 유세포분석 검정에 의해 측정시 약 54% band3-양성이다. 구현예들에서, 성숙 단계의 시작시, 세포의 집단은, 예를 들어, 유세포분석 검정에 의해 측정시 약 98% alpha4 인테그린-양성이다. 일 구현예에서, 성숙 단계는 적혈구 세포 집단 내의 세포의 약 53%가 band3 및 alpha4 인테그린 둘 모두에 대해 양성인 경우에 시작된다. 구현예들에서, 성숙 단계는 세포 집단이 주로 전-적혈모구 및 호염기성 적혈모구인 경우에 시작된다.
- [0284] 구현예들에서, 본원에 기재된 적혈구 세포 집단 내의 세포의 약 99%는 GPA에 대해 양성이다. 일 구현예에서, 적혈구 세포 집단 내의 세포의 약 98%는 band3에 대해 양성이다. 일 구현예에서, 적혈구 세포 집단 내의 세포의 약 91%는 alpha4 인테그린에 대해 양성이다. 일 구현예에서, 적혈구 세포 집단 내의 세포의 약 90%는 band3 및 alpha4 인테그린 둘 모두에 대해 양성이다. 구현예들에서, 세포 집단은 주로 다염 적혈모구 및 정염 적혈모구이다. 구현예들에서, 세포 집단은 약 3% 제핵된다. 구현예들에서, 세포 집단은 최대 제핵의 약 6%로 존재하고, 최대 제핵은 배양 종료시에 세포 집단이 도달하는 제핵의 백분율이다. 구현예들에서, 세포 집단은, 예를 들어, 실시예 10에 기재된 바와 같은 BONCAT 검정에서 약 2,410,000의 AHA 강도/혼입 값을 갖는다. 구현예들에서, 이러한 단계는 세포가 3일 동안 성숙 조건에 노출(M3일)된 경우에 도달된다.
- [0285] 구현예들에서, 본원에 기재된 적혈구 세포 집단 내의 세포의 약 99.5%는 GPA에 대해 양성이다. 일 구현예에서, 적혈구 세포 집단 내의 세포의 약 100%는 band3에 대해 양성이다. 일 구현예에서, 적혈구 세포 집단 내의 세포의 약 84.2%는 alpha4 인테그린에 대해 양성이다. 일 구현예에서, 적혈구 세포 집단 내의 세포의 약 84.2%는 band3 및 alpha4 인테그린 둘 모두에 대해 양성이다. 구현예들에서, 세포 집단은 주로 정염 적혈모구 및 망상적혈구이다. 구현예들에서, 세포 집단은 약 11% 제핵된다. 구현예들에서, 세포 집단은 최대 제핵의 약 22%로 존재한다. 구현예들에서, 세포 집단은 BONCAT 검정에서 약 1,870,000의 AHA 강도/혼입 값을 갖는다. 구현예들에서, 이러한 단계는 세포가 5일 동안 성숙 조건에 노출(M5일)된 경우에 도달된다.
- [0286] 구현예들에서, 세포 집단은 약 34% 제핵된다. 구현예들에서, 세포 집단은 최대 제핵의 약 68%로 존재한다. 구현예들에서, 세포 집단은 BONCAT 검정에서 약 615,000의 AHA 강도/혼입 값을 갖는다. 구현예들에서, 이러한 단계는 세포가 7일 동안 성숙 조건에 노출(M7일)된 경우에 도달된다.
- [0287] 구현예들에서, 세포 집단은 약 43% 제핵된다. 구현예들에서, 세포 집단은 최대 제핵의 약 86%로 존재한다. 구현예들에서, 세포 집단은 BONCAT 검정에서 약 189,000의 AHA 강도/혼입 값을 갖는다. 구현예들에서, 이러한 단계는 세포가 9일 동안 성숙 조건에 노출(M9일)된 경우에 도달된다.
- [0288] 구현예들에서, 적혈구 세포는 전-적혈모구, 조기 호염기성 적혈모구, 후기 호염기성 적혈모구, 다염 적혈모구, 정염 적혈모구, 망상적혈구, 또는 적혈구로부터 선택된다.
- [0289] **본원의 조성물, 예를 들어 적혈구 세포를 이용한 처리 방법**
- [0290] 외인성 RNA 및/또는 단백질을 포함(예를 들어, 발현)하는 적혈구 세포를 투여하는 방법은, 예를 들어, W02015/073587호 및 W02015/153102호에 기재되어 있으며, 이들 각각의 전체내용은 참조로서 포함된다.
- [0291] 구현예들에서, 본원에 기재된 적혈구 세포는 대상체, 예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 인간에게 투여된다. 치료될 수 있는 예시적 포유동물은 인간, 가축(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 및 실험용 동물(예를 들어, 원숭이, 래트, 마우스, 토끼, 기니아 피그 등)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 기재된 방법은 인간 요법 및 수의 적용 둘 모두에 적용 가능하다.
- [0292] 일부 구현예에서, 적혈구 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개월마다 환자에게 투여된다.
- [0293] 일부 구현예에서, 적혈구 세포의 용량은 약 1×10^9 내지 2×10^9 , 2×10^9 내지 5×10^9 , 5×10^9 내지 1×10^{10} , $1 \times$

10^{10} 내지 2×10^{10} , 2×10^{10} 내지 5×10^{10} , 5×10^{10} 내지 1×10^{11} , 1×10^{11} 내지 2×10^{11} , 2×10^{11} 내지 5×10^{11} , 5×10^{11} 내지 1×10^{12} , 1×10^{12} 내지 2×10^{12} , 2×10^{12} 내지 5×10^{12} , 또는 5×10^{12} 내지 1×10^{13} 개의 세포를 포함한다.

[0294] 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 본원에 기재된 조성물, 예를 들어, 본원에 기재된 제핵 적혈구 세포를 본원에 기재된 질병 또는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 본원에 기재된 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 질병 또는 질환은 암, 감염(예를 들어, 바이러스 또는 박테리아 감염), 염증성 질병, 자가면역 질병, 또는 대사 결핍이다. 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 본원에 기재된 질병 또는 질환을 치료하기 위한 본원에 기재된 적혈구 세포의 용도를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명의 개시는 본원에 기재된 질병 또는 질환을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 기재된 적혈구 세포의 용도를 제공한다.

[0295] 암의 유형은 급성 림프모구 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 항문암, 담관암, 방광암, 골암, 장암, 뇌종양, 유방암, 공지되지 않은 원발성 암, 뼈로 전이된 암, 뇌로 전이된 암, 간으로 전이된 암, 폐로 전이된 암, 유암종, 자궁경부암, 용모막암종, 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 결장암, 결장직장암, 자궁내막암, 안구암, 담낭암, 위암, 임신 용모 종양(GTT), 털세포 백혈병, 두경부암, 호지킨 림프종, 신장암, 후두암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종 피부암, 증피종, 남성암, 기태 임신, 구강암 및 입인두암, 골수종, 비강암 및 부비동암, 코인두암, 비-호지킨 림프종(NHL), 식도암, 난소암, 췌장암, 음경암, 전립선암, 희귀암, 직장암, 타액선암, 속발성 암, 피부암(비-흑색종), 연조직 육종, 위암, 고환암, 갑상선암, 공지되지 않은 원발성 암, 자궁암, 질암, 및 외음부암을 포함한다.

[0296] 바이러스 감염은 아데노바이러스, 콕사키바이러스, A형 간염 바이러스, 폴리오바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 단순 헤르페스 타입 1, 단순 헤르페스 타입 2, 인간 사이토메갈로바이러스, 인간 헤르페스바이러스 타입 8, 수두-대상포진 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 광견병 바이러스, 및 풍진 바이러스를 포함한다. 다른 바이러스 표적은 파라믹소바이러스과(예를 들어, 페렴바이러스, 홍역바이러스, 메타뉴모바이러스, 레스피로바이러스 또는 루블라바이러스), 아데노바이러스과(예를 들어, 아데노바이러스), 아레나바이러스과(예를 들어, 아레나바이러스, 예를 들어, 림프구 맥락수막염 바이러스), 아르테리아바이러스과(예를 들어, 돼지 호흡기 및 생식기 중후군 바이러스 또는 말 동맥염 바이러스), 분야바이러스과(예를 들어, 플레보바이러스 또는 한타바이러스), 칼리시바이러스과(예를 들어, 노로 바이러스), 코로나바이러스과(예를 들어, 코로나바이러스 또는 토로바이러스), 필로바이러스과(예를 들어, 에볼라-유사 바이러스), 플라비바이러스과(예를 들어, 헤파시바이러스 또는 플라비바이러스), 헤르페스바이러스과(예를 들어, 심플렉스 바이러스, 바리셀로바이러스, 사이토메갈로바이러스, 로세올로바이러스, 또는 림포크립토바이러스), 오르토크스 바이러스과(예를 들어, 인플루엔자 바이러스 또는 토고토바이러스), 파르보바이러스과(예를 들어, 파르보바이러스), 피코마바이러스과(예를 들어, 엔테로바이러스 또는 헤파토바이러스), 포스바이러스과(예를 들어, 오르토폭스 바이러스, 아비폭스 바이러스, 또는 레포리폭스 바이러스), 레트로바이러스과(예를 들어, 렌티바이러스 또는 스푸마바이러스), 레오바이러스과(예를 들어, 로타바이러스), 랩도바이러스과(예를 들어, 리사바이러스, 노비랍도 바이러스, 또는 베시콜로바이러스), 및 토가바이러스과(예를 들어, 알파바이러스 또는 루비바이러스)를 포함한다. 이들 바이러스의 특정 예는 인간 호흡기 코로나바이러스, 인플루엔자 바이러스 A 내지 C, 간염 바이러스 A 내지 G, 및 단순 헤르페스 바이러스 1 내지 9를 포함한다.

[0297] 박테리아 감염은 미코박테리아(Mycobacteria), 리케차(Rickettsia), 미코플라스마(Mycoplasma), 나이세리아 메닝기티데스(Neisseria meningitides), 나이세리아 고노레오에아에(Neisseria gonorrhoeae), 레지오넬라(Legionella), 비브리오 콜레라에(Vibrio cholerae), 스트렙토코키(Streptococci), 스태필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 스태필로코커스 에피더미디스(Staphylococcus epidermidis), 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa), 코리노박테리아 디프테리아에(Corynebacteria diphtheriae), 클로스트리듐 종(Clostridium spp.), 장독소생성 에스케리키아 콜리(Eschericia coli), 바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis), 리케차(Rickettsia), 바르토넬라 헨셀라에(Bartonella henselae), 바르토넬라 퀸타나(Bartonella quintana), 콕시엘라 부르네티(Coxiella burnetii), 클라미디아(chlamydia), 미코박테리움 레프라이에(Mycobacterium leprae), 살모넬라(Salmonella); 시겔라(shigella); 예르시니아 엔테로콜리티카(Yersinia enterocolitica); 예르시니아 슈도튜베로콜로시스(Yersinia pseudotuberculosis); 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila); 미코박테리움 튜베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis); 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes); 미코플라스마 종(Mycoplasma spp.); 슈도모나스 플루오레센스(Pseudomonas

fluorescens); 비브리오 콜레라에(Vibrio cholerae); 헤모필루스 인플루엔자에(Haemophilus influenzae); 바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis); 트레포네마 팔리둠(Treponema pallidum); 렙토스피라(Leptospira); 보렐리아(Borrelia); 코리네박테리움 디프테리아에(Corynebacterium diphtheriae); 프란시셀라(Francisella); 브루셀라 멜리텐시스(Brucella melitensis); 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni); 엔테로박터(Enterobacter); 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis); 프로테우스(Proteus); 및 클렙시엘라 뉴모니아에(Klebsiella pneumoniae)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0298] 염증성 질병은 박테리아 패혈증, 류마티스 관절염, 연령 관련 황반 변성(AMD), 전신 홍반 루푸스(결합 조직의 염증성 장애), 사구체신염(신장의 모세혈관의 염증), 크론병, 췌양성 대장염, 복강염, 또는 다른 특발성 염증성 장질환, 및 알레르기 천식을 포함한다.
- [0299] 자가면역 질병은 전신 홍반 루푸스, 사구체신염, 류마티스 관절염, 다발경화증, 및 타입 1 당뇨병을 포함한다.
- [0300] 대사 결핍은 페닐케톤뇨증(PKU), 아데노신 데아미나제 결핍-중증 복합 면역결핍(ADA-SCID), 미토콘드리아 신경 위장 뇌병증(MNGIE), 원발성 과옥살산뇨증, 알칼톤뇨증, 및 혈전 저혈소판혈증 자색반병(TTP)을 포함한다.
- [0301] 예시적인 추가 특징 및 구현예가 하기에 제공된다:
- [0302] 1. 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법으로서,
- [0303] a) 성숙 단계의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0304] b) 적혈구 세포에 의한 핵산, 예를 들어, mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, mRNA와 적혈구 세포를 접촉시킴으로써, 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0305] 2. 구현예 1에 있어서, 적혈구 세포가 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, mRNA를 흡수하는 방법.
- [0306] 3. 구현예 1에 있어서, 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 적혈구 세포 집단의 복수의 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, mRNA를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0307] 4. 구현예 3에 있어서, 적혈구 세포 집단의 복수의 세포가 각각 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, mRNA를 흡수하는 방법.
- [0308] 5. 구현예 1 내지 구현예 4 중 임의의 구현예에서, 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, mRNA의 흡수 후, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 발현하는 방법.
- [0309] 6. 구현예 5에 있어서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 포함하는 방법.
- [0310] 7. 구현예 3 내지 구현예 6 중 임의의 구현예에서, 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단이 3 내지 7일, 예를 들어, 4 내지 5일 또는 4 내지 6일 동안 성숙 배지에서 확장된 세포의 집단인 방법.
- [0311] 8. 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구의 집단을 제조하는 방법으로서,
- [0312] (a) 적혈구 전구 세포(예를 들어, CD34+ 세포)의 집단을 제공하는 단계;
- [0313] (b) 분화하는 적혈구 세포의 집단을 제공하는 분화 조건하에서 적혈구 전구 세포의 집단을 배양하는 단계;
- [0314] (c) 분화하는 적혈구 세포 집단의 복수의 세포에 의한 핵산, 예를 들어, mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, mRNA와 분화하는 적혈구 세포 집단의 복수의 세포를 접촉시키는 단계; 및
- [0315] (d) 분화하는 적혈구 세포 집단의 복수의 세포를 추가로 배양하여 망상적혈구 집단을 제공함으로써, 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구 집단을 제조하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0316] 9. 구현예 8에 있어서, 추가 배양이 3, 2, 또는 1회 미만의 집단 배가를 포함하는 방법.
- [0317] 10. 구현예 3 내지 구현예 9 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21개 이상)을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법:
- [0318] i.a) 집단 내의 세포의 2 내지 40%, 3 내지 33%, 5 내지 30%, 10 내지 25%, 또는 15 내지 20%가 제핵되거나;

- [0319] i.b) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 2%, 3%, 4%, 또는 5% 미만인 제핵되거나;
- [0320] i.c) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 6%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만인 제핵되거나;
- [0321] i.d) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 미만인 제핵되거나;
- [0322] i.e) 집단 내의 세포의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하가 제핵되거나;
- [0323] i.f) 집단 내의 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 이하가 제핵되거나;
- [0324] i.g) 세포의 집단이 최대 제핵의 6 내지 70%, 10 내지 60%, 20 내지 50%, 또는 30 내지 40%에 도달하거나;
- [0325] i.h) 세포의 집단이 최대 제핵의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하에 도달하거나;
- [0326] i.i) 세포의 집단이 최대 제핵의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 60% 이하에 도달하거나;
- [0327] ii.a) 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토로부터 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가하거나;
- [0328] ii.b) 세포의 집단이 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가할 수 있거나;
- [0329] ii.c) 집단이 집단 내의 세포의 적어도 70%의 제핵 수준에 도달하기 전에 집단이 1.5, 2, 또는 3배 이하만큼 증가하거나;
- [0330] iii.a) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0331] iii.b) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0332] iii.c) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0333] iii.d) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0334] iii.e) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0335] iii.f) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0336] iv.a) 세포의 집단이 최대 번역 활성의 적어도 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 갖거나;
- [0337] iv.b) 세포의 집단이 최대 번역 활성의 적어도 20%, 30%, 40%, 또는 50%를 갖거나;
- [0338] iv.c) 세포의 집단이 BONCAT 검정, 예를 들어, 실시예 10의 번역 검정에 의해 측정시 적어도 600,000, 800,000, 1,000,000, 1,200,000, 1,400,000, 1,600,000, 1,800,000, 2,000,000, 2,200,000, 또는 2,400,000의 번역 활성을 갖거나;
- [0339] iv. d) 세포의 집단이 BONCAT 검정, 예를 들어, 실시예 10의 번역 검정에 의해 측정시 600,000 내지 2,400,000, 800,000 내지 2,200,000, 1,000,000 내지 2,000,000, 1,200,000 내지 1,800,000, 또는 1,400,000 내지 1,600,000의 번역 활성을 갖는다.
- [0340] 11. 구현예 10에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 ii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0341] 12. 구현예 10에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0342] 13. 구현예 10에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0343] 14. 구현예 10에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성 및 iii로부터

이 ii.c 및 iv.a의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

- [0512] 183. 구현예 10 내지 구현예 20 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii.a 및 iv.b의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0513] 184. 구현예 10 내지 구현예 20 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii.b 및 iv.b의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0514] 185. 구현예 10 내지 구현예 20 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii.c 및 iv.b의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0515] 186. 구현예 10 내지 구현예 20 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii.a 및 iv.c의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0516] 187. 구현예 10 내지 구현예 20 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii.b 및 iv.c의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0517] 188. 구현예 10 내지 구현예 20 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii.c 및 iv.c의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0518] 189. 구현예 10 내지 구현예 20 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii.a 및 iv.d의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0519] 190. 구현예 10 내지 구현예 20 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii.b 및 iv.d의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0520] 191. 구현예 10 내지 구현예 20 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii.c 및 iv.d의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0521] 192. 구현예 3 내지 구현예 191 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 84 내지 99%, 85 내지 95%, 또는 약 90%가 GPA-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0522] 193. 구현예 3 내지 구현예 191 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 적어도 84%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 GPA-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0523] 194. 구현예 3 내지 구현예 191 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 54 내지 99%, 55 내지 98%, 60 내지 95%, 65 내지 90%, 70 내지 85%, 또는 75 내지 80%가 band3-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0524] 195. 구현예 3 내지 구현예 191 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 적어도 54%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%가 band3-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0525] 196. 구현예 3 내지 구현예 191 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 96 내지 100%, 97 내지 99%, 또는 약 98%가 alpha4 인테그린-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0526] 197. 구현예 3 내지 구현예 191 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의해 측정시 집단 내의 세포의 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 alpha4 인테그린-양성인 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0527] 198. 구현예 3 내지 구현예 197 중 임의의 구현예에서, 복수의 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를 들어, mRNA를 접촉시키기 전 또는 후에, 복수의 세포가 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단으로부터 분리되고, 예를 들어, 복수의 세포가 제핵 상태를 기초로 하여 집단으로부터 분리(예를 들어, 복수의 세포는 유허 세포이고, 집단의 나머지는 제핵 세포임)되는 방법.
- [0528] 199. 구현예 3 내지 구현예 197 중 임의의 구현예에서, 복수의 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 핵산, 예를

들어, mRNA를 접촉시키기 전 또는 후에, 예를 들어, 집단과 제핵의 억제제(예를 들어, 히스톤 데아세틸라제(HDAC)의 억제제, 미토겐-활성화 단백질 키나제(MAPK)의 억제제, 사이클린-의존성 키나제(CDK)의 억제제, 또는 프로테아솜 억제제)를 인큐베이션함으로써, 예를 들어, 집단의 성장, 발달, 헤모글로빈 합성, 또는 제핵 과정을 정지시킴으로써 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단을 동기화시키는 단계를 포함하는 방법.

- [0529] 200. 구현예 199에 있어서, 정지가 집단 내의 세포의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10% 초과인 제핵 전에 발생하는 방법.
- [0530] 201. 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구의 집단을 제조하는 방법으로서,
- [0531] (e) 적혈구 전구 세포(예를 들어, CD34+ 세포)의 집단을 제공하는 단계;
- [0532] (f) 분화하는 적혈구 세포의 집단을 제공하는 분화 조건하에서 적혈구 전구 세포의 집단을 배양하는 단계;
- [0533] (g) 분화하는 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA와 분화하는 적혈구 세포를 접촉시키는 단계로서, 분화하는 적혈구 세포의 집단이 0.1 내지 25%가 제핵(예를 들어, 0.1 내지 20%가 제핵되거나, 0.1 내지 15%가 제핵되거나, 0.1 내지 12%가 제핵되거나, 0.1 내지 10%가 제핵됨)되는 경우에 접촉이 수행되는, 단계; 및
- [0534] (h) 분화하는 적혈구 세포를 추가로 배양하여 망상적혈구 집단을 제공함으로써, 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구 집단을 제조하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0535] 202. 구현예 201에 있어서, 추가 배양이 3, 2, 또는 1회 미만의 집단 배가를 포함하는 방법.
- [0536] 203. 구현예 201 또는 구현예 202에 있어서, 분화하는 적혈구 세포의 적어도 50%(적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 95%)가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내는 경우에 접촉이 수행되는 방법.
- [0537] 204. 외인성 단백질을 발현하는 망상적혈구의 집단을 제조하는 방법으로서, (a) 적혈구 전구 세포의 집단을 제공하는 단계, (b) 분화하는 적혈구 세포의 집단을 제공하는 분화 조건하에서 적혈구 전구 세포의 집단을 배양하는 단계, (c) 분화하는 적혈구 세포와 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계로서, 분화하는 적혈구 세포의 집단이 0.1 내지 25%가 제핵(예를 들어, 0.1 내지 20%가 제핵되거나, 0.1 내지 15%가 제핵되거나, 0.1 내지 12%가 제핵되거나, 0.1 내지 10%가 제핵됨)되는 경우에 접촉이 수행되는, 단계를 포함하는, 방법.
- [0538] 205. 구현예 204에 있어서, 분화하는 적혈구 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토 전에 3, 2, 또는 1회 미만의 집단 배가를 갖는 경우에 접촉이 수행되는 방법.
- [0539] 206. 구현예 204 또는 구현예 205에 있어서, 분화하는 적혈구 세포의 적어도 50%(적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 또는 95%)가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내는 경우에 접촉이 수행되는 방법.
- [0540] 207. 이중성 비번역 영역(UTR)에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포로서, 이중성 UTR이 조절 요소를 포함하는, 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포.
- [0541] 208. 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포.
- [0542] 209. 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 방법으로서,
- [0543] a) 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포와 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 접촉시키는 단계, 및
- [0544] b) 외인성 mRNA의 흡수에 적합한 조건하에서 접촉된 적혈구 세포를 유지시킴으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0545] 210. 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 방법으로서,
- [0546] a) 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포와 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하

는 외인성 mRNA를 접촉시키는 단계; 및

- [0547] b) 외인성 mRNA의 흡수에 적합한 조건하에서 접촉된 적혈구 세포를 유지시킴으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0548] 211. 제핵 적혈구 세포에서 외인성 단백질을 생성하는 방법으로서,
- [0549] a) 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0550] b) 외인성 단백질의 생성에 적합한 조건하에서 적혈구 세포를 배양함으로써 외인성 단백질을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0551] 212. 제핵 적혈구 세포에서 외인성 단백질을 생성하는 방법으로서,
- [0552] a) 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0553] b) 외인성 단백질의 생성에 적합한 조건하에서 적혈구 세포를 배양함으로써 외인성 단백질을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0554] 213. 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA(예를 들어, 분리된 RNA 또는 시험관 내 전사된 RNA)를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 대상체에 투여함으로써 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 단계를 포함하는,
- [0555] 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 방법.
- [0556] 214. 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 대상체에 투여함으로써 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 단계를 포함하는,
- [0557] 대상체에 외인성 단백질을 제공하거나, 대상체에 외인성 단백질을 생성할 수 있는 제핵 적혈구 세포를 제공하거나, 대상체를 치료하는 방법.
- [0558] 215. 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치(batch))를 평가하는 방법으로서,
- [0559] a) 조절 요소를 포함하는 이중성 UTR에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역을 포함하는 외인성 mRNA를 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 제공하는 단계, 및
- [0560] b) 미리 선택된 파라미터에 대해 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가함으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0561] 216. 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가하는 방법으로서,
- [0562] a) 표 1의 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드, 표 2의 하나 이상의 화학적 백본 변형, 표 3의 하나 이상의 화학적으로 변형된 캡, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0563] b) 미리 선택된 파라미터에 대해 적혈구 세포, 예를 들어, 유핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가함으로써 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포(또는 상기 세포의 배치)를 평가하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0564] 217. 구현예 207에 있어서, 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 외인성 단백질을 포함하는 방법.
- [0565] 218. 구현예 207에 있어서, 집단 내의 세포가, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.

- [0566] 219. 구현예 207에 있어서, 세포가 mRNA와의 접촉 후 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일 동안 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.
- [0567] 220. 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법으로서,
- [0568] mRNA의 분해를 억제하는 조건, 예를 들어, 반응 혼합물 중에 리보뉴클레아제 억제제의 포함에 의한 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA 및 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및
- [0569] 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 반응 혼합물을 유지시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0570] 221. 구현예 220에서, 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 상기 집단과 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0571] 222. 구현예 220 또는 구현예 221에 있어서, 집단의 복수의 적혈구 세포가 각각 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 흡수하는 방법.
- [0572] 223. 구현예 220 내지 구현예 222 중 임의의 구현예에서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 발현하는 방법.
- [0573] 224. 구현예 220 내지 구현예 223 중 임의의 구현예에서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 포함하는 방법.
- [0574] 225. 구현예 220 내지 구현예 224 중 임의의 구현예에서, 세포 또는 세포 집단을 전기천공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0575] 226. 구현예 220 내지 구현예 225 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단과 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0576] 227. 구현예 220 내지 구현예 226 중 임의의 구현예에서, 세포와 mRNA를 접촉시키기 전, 접촉시키는 동안, 또는 접촉시킨 후에 세포 집단과 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0577] 228. 구현예 220 내지 구현예 227 중 임의의 구현예에서, 성숙 단계 4, 5, 또는 6일에서 세포와 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0578] 229. 구현예 220 내지 구현예 228 중 임의의 구현예에서, 세포가 성숙 단계의 세포인 방법.
- [0579] 230. 구현예 220 내지 구현예 229 중 임의의 구현예에서, 세포가 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21개 이상)을 포함하는 경우에 세포와 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:
- [0580] i.a) 집단 내의 세포의 2 내지 40%, 3 내지 33%, 5 내지 30%, 10 내지 25%, 또는 15 내지 20%가 제핵되거나;
- [0581] i.b) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 2%, 3%, 4%, 또는 5% 미만이 제핵되거나;
- [0582] i.c) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 6%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만이 제핵되거나;
- [0583] i.d) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 미만이 제핵되거나;
- [0584] i.e) 집단 내의 세포의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하가 제핵되거나;
- [0585] i.f) 집단 내의 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 이하가 제핵되거나;
- [0586] i.g) 세포의 집단이 최대 제핵의 6 내지 70%, 10 내지 60%, 20 내지 50%, 또는 30 내지 40%에 도달하거나;
- [0587] i.h) 세포의 집단이 최대 제핵의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하에 도달하거나;
- [0588] i.i) 세포의 집단이 최대 제핵의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 60% 이하에 도달하거나;
- [0589] ii.a) 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토로부터 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가하거나;

- [0590] ii.b) 세포의 집단이 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가할 수 있거나;
- [0591] ii.c) 집단이 집단 내의 세포의 적어도 70%의 제핵 수준에 도달하기 전에 집단이 1.5, 2, 또는 3배 이하만큼 증가하거나;
- [0592] iii.a) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0593] iii.b) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0594] iii.c) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0595] iii.d) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0596] iii.e) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0597] iii.f) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0598] iv.a) 세포의 집단이 최대 번역 활성의 적어도 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 갖거나;
- [0599] iv.b) 세포의 집단이 최대 번역 활성의 적어도 20%, 30%, 40%, 또는 50%를 갖거나;
- [0600] iv.c) 세포의 집단이 BONCAT 검정, 예를 들어, 실시예 10의 번역 검정에 의해 측정시 적어도 600,000, 800,000, 1,000,000, 1,200,000, 1,400,000, 1,600,000, 1,800,000, 2,000,000, 2,200,000, 또는 2,400,000의 번역 활성을 갖거나;
- [0601] iv. d) 세포의 집단이 BONCAT 검정, 예를 들어, 실시예 10의 번역 검정에 의해 측정시 600,000 내지 2,400,000, 800,000 내지 2,200,000, 1,000,000 내지 2,000,000, 1,200,000 내지 1,800,000, 또는 1,400,000 내지 1,600,000의 번역 활성을 갖는다.
- [0602] 231. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 ii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0603] 232. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0604] 233. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0605] 234. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0606] 235. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0607] 236. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 iii로부터의 특성 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0608] 237. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성, ii로부터의 특성, 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0609] 238. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성, ii로부터의 특성, 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0610] 239. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성, iii로부터의 특성, 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0611] 240. 구현예 230에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성, iii로부

터의 특성, 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

- [0612] 241. 구현예 220 내지 구현예 240 중 임의의 구현예에서, 세포가 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 이상)을 포함하는 경우(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의함)에 세포와 리보뉴클레아제 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:
- [0613] 집단 내의 세포의 84 내지 99%, 85 내지 95%, 또는 약 90%가 GPA-양성이거나;
- [0614] 집단 내의 세포의 적어도 84%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 GPA-양성이거나;
- [0615] 집단 내의 세포의 54 내지 99%, 55 내지 98%, 60 내지 95%, 65 내지 90%, 70 내지 85%, 또는 75 내지 80%가 band3-양성이거나;
- [0616] 집단 내의 세포의 적어도 54%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%가 band3-양성이거나;
- [0617] 집단 내의 세포의 96 내지 100%, 97 내지 99%, 또는 약 98%가 alpha4 인테그린-양성이거나;
- [0618] 집단 내의 세포의 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 alpha4 인테그린-양성이다.
- [0619] 242. 구현예 220 내지 구현예 241 중 임의의 구현예에서, mRNA가 시험관 내 전사된 mRNA인 방법.
- [0620] 243. 구현예 220 내지 구현예 242 중 임의의 구현예에서, 집단의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 생존 가능한 방법.
- [0621] 244. 구현예 220 내지 구현예 243 중 임의의 구현예에서, 집단의 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%가, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 방법.
- [0622] 245. 구현예 220 내지 구현예 244 중 임의의 구현예에서, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 세포의 비율이 리보뉴클레아제 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단에서 제핵되는 세포의 비율의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%인 방법.
- [0623] 246. 구현예 220 내지 구현예 245 중 임의의 구현예에서, 세포의 집단이, 세포가 mRNA와 접촉시에 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 개의 세포를 포함하는 방법.
- [0624] 247. 구현예 220 내지 구현예 246 중 임의의 구현예에서, 세포의 집단이, 세포가 mRNA와 접촉된 후 5일 이내에 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 확장되는 방법.
- [0625] 248. 구현예 220 내지 구현예 247 중 임의의 구현예에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질을 발현하는 방법.
- [0626] 249. 구현예 220 내지 구현예 248 중 임의의 구현예에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.
- [0627] 250. 구현예 220 내지 구현예 249 중 임의의 구현예에서, 세포의 집단이 리보뉴클레아제 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상, 또는 적어도 2배, 3배, 4배, 또는 5배 더 많은 외인성 단백질을 포함하는 방법.
- [0628] 251. i) 적혈구 세포, ii) 외인성 단백질을 포함하는 mRNA 및 iii) 리보뉴클레아제 억제제를 포함하는 반응 혼합물.
- [0629] 252. 구현예 251에 있어서, mRNA가 적혈구 세포 내에 있는 반응 혼합물.
- [0630] 253. 구현예 251 또는 구현예 252에 있어서, 복수의 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물.
- [0631] 254. 리보뉴클레아제 억제제에 대한 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 검정하는 방법으로서,
- [0632] 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및
- [0633] 예를 들어, 반응 혼합물의 분취액에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, 또는 질량분광법에 의해 리보뉴클레아제 억제제의 존재 또는 수준을 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

- [0634] 255. 구현예 254에 있어서, 리보뉴클레아제 억제제의 수준을 참조 값과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0635] 256. 구현예 255에 있어서, 상기 비교에 반응하여,
- [0636] 집단을, 예를 들어, 필요조건을 충족하거나 필요조건을 충족하지 않는 것으로 분류하는 단계로서, 예를 들어, 리보뉴클레아제 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 필요조건이 충족되는 단계,
- [0637] 예를 들어, 리보뉴클레아제 억제제의 수준이 참조 값보다 위인 경우에 집단이 이후 정제 단계에 적합한 경우와 같이 집단을 이후의 처리 단계에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계,
- [0638] 집단을 치료제로 사용하기에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계, 또는
- [0639] 예를 들어, 리보뉴클레아제 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 집단 또는 이의 분취액을 치료제로 사용하기 위해 제형화하거나 패키징하는 단계 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 방법.
- [0640] 257. 구현예 220 내지 구현예 256 중 임의의 구현예에서, 리보뉴클레아제 억제제가 RNasin Plus, Protector RNase Inhibitor, 또는 Ribonuclease Inhibitor Huma인 반응 혼합물 또는 방법.
- [0641] 258. 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법으로서,
- [0642] 단백질 분해를 억제하는 조건, 예를 들어, 반응 혼합물 중에 프로테아솜 억제제의 포함에 의한 조건하에서 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA 및 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및
- [0643] 적혈구 세포에 의한 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 반응 혼합물을 유지시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0644] 259. 구현예 258에 있어서, 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계 및 상기 집단과 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0645] 260. 구현예 258 또는 구현예 259에 있어서, 집단의 복수의 적혈구 세포가 각각 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 흡수하는 방법.
- [0646] 261. 구현예 258 내지 구현예 260 중 임의의 구현예에서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 발현하는 방법.
- [0647] 262. 구현예 258 내지 구현예 261 중 임의의 구현예에서, 세포 또는 복수의 세포가 외인성 단백질을 포함하는 방법.
- [0648] 263. 구현예 258 내지 구현예 262 중 임의의 구현예에서, 세포 또는 세포 집단을 전기천공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0649] 264. 구현예 258 내지 구현예 263 중 임의의 구현예에서, 적혈구 세포의 집단과 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0650] 265. 구현예 258 내지 구현예 264 중 임의의 구현예에서, 세포와 mRNA를 접촉시키기 전, 접촉시키는 동안, 또는 접촉시킨 후, 예를 들어, 세포와 mRNA를 접촉시키기 0.5 내지 2일 전 또는 0.5 내지 2일 후에 세포 집단과 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0651] 266. 구현예 258 내지 구현예 265 중 임의의 구현예에서, 성숙 단계 4, 5, 또는 6일에서 세포와 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0652] 267. 구현예 258 내지 구현예 266 중 임의의 구현예에서, 세포가 성숙 단계의 세포인 방법.
- [0653] 268. 구현예 258 내지 구현예 267 중 임의의 구현예에서, 세포가 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21개 이상)을 포함하는 경우에 세포와 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:
 - [0654] i.a) 집단 내의 세포의 2 내지 40%, 3 내지 33%, 5 내지 30%, 10 내지 25%, 또는 15 내지 20%가 제핵되거나;
 - [0655] i.b) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 2%, 3%, 4%, 또는 5% 미만인 제핵되거나;
 - [0656] i.c) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 6%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만인 제핵되거나;

- [0657] i.d) 집단 내의 세포의 0%, 0.1%, 0.2%, 또는 0.5% 초과이나, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 미만이 제핵되거나;
- [0658] i.e) 집단 내의 세포의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하가 제핵되거나;
- [0659] i.f) 집단 내의 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 이하가 제핵되거나;
- [0660] i.g) 세포의 집단이 최대 제핵의 6 내지 70%, 10 내지 60%, 20 내지 50%, 또는 30 내지 40%에 도달하거나;
- [0661] i.h) 세포의 집단이 최대 제핵의 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 또는 20% 이하에 도달하거나;
- [0662] i.i) 세포의 집단이 최대 제핵의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 60% 이하에 도달하거나;
- [0663] ii.a) 세포의 집단이 세포 분열에서 플래토로부터 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가하거나;
- [0664] ii.b) 세포의 집단이 3, 2, 또는 1회 미만으로 집단 배가할 수 있거나;
- [0665] ii.c) 집단이 집단 내의 세포의 적어도 70%의 제핵 수준에 도달하기 전에 집단이 1.5, 2, 또는 3배 이하만큼 증가하거나;
- [0666] iii.a) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0667] iii.b) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0668] iii.c) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)이거나;
- [0669] iii.d) 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0670] iii.e) 집단 내의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 79%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0671] iii.f) 집단 내의 세포의 30 내지 90%, 40 내지 90%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 또는 70 내지 90%가 적혈모구(예를 들어, 다염 또는 정염 적혈모구)의 형태를 나타내거나;
- [0672] iv.a) 세포의 집단이 최대 번역 활성의 적어도 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 갖거나;
- [0673] iv.b) 세포의 집단이 최대 번역 활성의 적어도 20%, 30%, 40%, 또는 50%를 갖거나;
- [0674] iv.c) 세포의 집단이 BONCAT 검정, 예를 들어, 실시예 10의 번역 검정에 의해 측정시 적어도 600,000, 800,000, 1,000,000, 1,200,000, 1,400,000, 1,600,000, 1,800,000, 2,000,000, 2,200,000, 또는 2,400,000의 번역 활성을 갖거나;
- [0675] iv. d) 세포의 집단이 BONCAT 검정, 예를 들어, 실시예 10의 번역 검정에 의해 측정시 600,000 내지 2,400,000, 800,000 내지 2,200,000, 1,000,000 내지 2,000,000, 1,200,000 내지 1,800,000, 또는 1,400,000 내지 1,600,000의 번역 활성을 갖는다.
- [0676] 269. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 ii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0677] 270. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0678] 271. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0679] 272. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0680] 273. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.

- [0681] 274. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 iii로부터의 특성 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0682] 275. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성, ii로부터의 특성, 및 iii로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0683] 276. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성, ii로부터의 특성, 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0684] 277. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 i로부터의 특성, iii로부터의 특성, 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0685] 278. 구현예 268에 있어서, 적혈구 세포의 집단 또는 분화하는 적혈구 세포의 집단이 ii로부터의 특성, iii로부터의 특성, 및 iv로부터의 특성을 포함하는 적혈구 세포의 집단인 방법.
- [0686] 279. 구현예 258 내지 구현예 278 중 임의의 구현예에서, 세포가 하기 특성 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 이상)을 포함하는 경우(예를 들어, 유세포분석 검정, 예를 들어, 실시예 10의 유세포분석 검정에 의함)에 세포와 프로테아솜 억제제를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:
- [0687] 집단 내의 세포의 84 내지 99%, 85 내지 95%, 또는 약 90%가 GPA-양성이거나;
- [0688] 집단 내의 세포의 적어도 84%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%가 GPA-양성이거나;
- [0689] 집단 내의 세포의 54 내지 99%, 55 내지 98%, 60 내지 95%, 65 내지 90%, 70 내지 85%, 또는 75 내지 80%가 band3-양성이거나;
- [0690] 집단 내의 세포의 적어도 54%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%가 band3-양성이거나;
- [0691] 집단 내의 세포의 96 내지 100%, 97 내지 99%, 또는 약 98%가 alpha4 인테그린-양성이거나;
- [0692] 집단 내의 세포의 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 alpha4 인테그린-양성이다.
- [0693] 280. 구현예 258 내지 구현예 279 중 임의의 구현예에서, mRNA가 시험관 내 전사된 mRNA인 방법.
- [0694] 281. 구현예 258 내지 구현예 280 중 임의의 구현예에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 생존 가능한 방법.
- [0695] 282. 구현예 258 내지 구현예 281 중 임의의 구현예에서, 집단의 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%가, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 방법.
- [0696] 283. 구현예 258 내지 구현예 282 중 임의의 구현예에서, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 제핵되는 세포의 비율이 프로테아솜 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단에서 제핵되는 세포의 비율의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%인 방법.
- [0697] 284. 구현예 258 내지 구현예 283 중 임의의 구현예에서, 세포의 집단이, 세포가 mRNA와 접촉시에 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 개의 세포를 포함하는 방법.
- [0698] 285. 구현예 258 내지 구현예 284 중 임의의 구현예에서, 세포의 집단이, 세포가 mRNA와 접촉된 후 5일 이내에 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%만큼 확장되는 방법.
- [0699] 286. 구현예 258 내지 구현예 285 중 임의의 구현예에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질을 발현하는 방법.
- [0700] 287. 구현예 258 내지 구현예 286 중 임의의 구현예에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 예를 들어, 세포가 mRNA와 접촉된 지 5일 후에 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.
- [0701] 288. 구현예 258 내지 구현예 287 중 임의의 구현예에서, 세포의 집단이 프로테아솜 억제제로 처리되지 않은 달리 유사한 세포 집단보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상, 또는 적어도 2배, 3배, 4배, 또는 5배 더 많은 외인성 단백질을 포함하는 방법.

- [0702] 289. i) 적혈구 세포, ii) 외인성 단백질을 포함하는 mRNA 및 iii) 프로테아솜 억제제를 포함하는 반응 혼합물.
- [0703] 290. 구현예 289에 있어서, mRNA가 적혈구 세포 내에 있는 반응 혼합물.
- [0704] 291. 구현예 289 또는 구현예 290에 있어서, 복수의 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물.
- [0705] 292. 프로테아솜 억제제에 대한 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 검정하는 방법으로서,
- [0706] 외인성 단백질을 포함하는 제핵 적혈구 세포를 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및
- [0707] 예를 들어, 반응 혼합물의 분취액에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, 또는 질량분광법에 의해 프로테아솜 억제제의 존재 또는 수준을 검정하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0708] 293. 구현예 292에 있어서, 프로테아솜 억제제의 수준을 참조 값과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0709] 294. 구현예 293에 있어서, 상기 비교에 반응하여,
- [0710] 집단을, 예를 들어, 필요조건을 충족하거나 필요조건을 충족하지 않는 것으로 분류하는 단계로서, 예를 들어, 프로테아솜 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 필요조건이 충족되는 단계,
- [0711] 예를 들어, 프로테아솜 억제제의 수준이 참조 값보다 위인 경우에 집단이 이후 정제 단계에 적합한 경우와 같이 집단을 이후의 처리 단계에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계,
- [0712] 집단을 치료제로 사용하기에 적합하거나 적합하지 않은 것으로 분류하는 단계, 또는
- [0713] 예를 들어, 프로테아솜 억제제의 수준이 참조 값 아래인 경우에 집단 또는 이의 분취액을 치료제로 사용하기 위해 제형화하거나 패키징하는 단계 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 방법.
- [0714] 295. 구현예 258 내지 구현예 294 중 임의의 구현예에서, 프로테아솜 억제제가 20S 프로테아솜 억제제, 예를 들어, MG-132 또는 카르필조밐(carfilzomib), 또는 26S 프로테아솜 억제제, 예를 들어, 보르테조밐(bortezomib) 인 반응 혼합물 또는 방법.
- [0715] 296. 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 방법으로서,
- [0716] a) 적혈구 세포, 예를 들어, 성숙 단계의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0717] b) 적혈구 세포에 의한 제1 mRNA 및 제2 mRNA의 흡수를 가능하게 하는 조건하에서 제1 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA 및 제2 외인성 단백질을 인코딩하는 제2 mRNA와 적혈구 세포를 접촉시킴으로써 제1 mRNA 및 제2 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0718] 297. 구현예 296에 있어서, 적혈구 세포가, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질의 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.
- [0719] 298. 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 발현하는 적혈구 세포의 집단을 생성하는 방법으로서,
- [0720] a) 적혈구 세포, 예를 들어, 성숙 단계의 적혈구 세포의 집단을 제공하는 단계, 및
- [0721] b) 제1 단백질을 인코딩하는 제1 mRNA 및 제2 단백질을 인코딩하는 제2 mRNA와 적혈구 세포의 집단을 접촉시킴으로써 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하고,
- [0722] 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 제1 mRNA 및 제2 mRNA 둘 모두를 포함하는, 방법.
- [0723] 299. 구현예 298에 있어서, 적혈구 세포의 집단이, 예를 들어, mRNA와의 접촉 5일 후에 세포 당 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질의 평균 적어도 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 또는 100,000개의 카피를 포함하는 방법.
- [0724] 300. 구현예 296 내지 구현예 299 중 임의의 구현예에서, 접촉 단계가 전기천공을 수행하는 것을 포함하는 방법.
- [0725] 301. 구현예 298 내지 구현예 300 중 임의의 구현예에서, 세포의 집단이, 세포가 제1 및 제2 mRNA와 접촉한 후 적어도 5일 동안 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%에서 제1 외인성 단백질 및 제2

외인성 단백질을 포함하는 방법.

- [0726] 302. 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 제1 외인성 단백질 및 제2 외인성 단백질을 발현하는 적혈구 세포의 집단으로서, 집단이 세포와 제1 또는 제2 외인성 단백질을 인코딩하는 DNA와 접촉시킴으로써 제조되지 않은, 적혈구 세포의 집단.
- [0727] 303. 세포 당 소정의 수의 외인성 단백질의 카피를 포함하는 복수의 적혈구 세포를 생성하는 방법으로서, 집단과 소정량의 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시킴으로써 소정량의 외인성 단백질을 포함하는 적혈구 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0728] 304. 구현예 303에 있어서, 복수의 적혈구 세포(예를 들어, 제핵 적혈구 세포) 중 하나 이상을 평가하여 외인성 단백질의 양을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0729] 305. 적혈구 세포, 예를 들어, 제핵 적혈구 세포의 샘플에서 외인성 단백질의 양을 평가하는 방법으로서,
- [0730] 집단과 소정량의 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉시킴으로써 제조된 세포 당 소정의 수의 외인성 단백질의 카피를 포함하는 복수의 적혈구 세포를 제공하는 단계, 및
- [0731] 복수의 적혈구 세포에서 외인성 단백질의 양을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0732] 306. 구현예 303 내지 구현예 305 중 임의의 구현예에서,
- [0733] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.6 \pm 20\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $1,000,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
- [0734] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.4 \pm 20\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $870,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
- [0735] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.2 \pm 20\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $610,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
- [0736] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.1 \pm 20\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $270,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
- [0737] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.05 \pm 20\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $100,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키거나,
- [0738] 세포 집단과 집단 내의 5E6 세포 당 $0.025 \pm 20\%$ μg 의 mRNA를 접촉시켜 세포 당 $43,000 \pm 20\%$ 카피의 외인성 단백질을 발현하는 세포의 집단을 발생시키는, 방법.
- [0739] 307. 구현예 303 내지 구현예 306 중 임의의 구현예에서, 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가, 세포가 외인성 단백질과 접촉된 지 1일 후에 외인성 단백질을 발현하는 방법.

[0740] **실시예**

[0741] 실시예 1: 외인성의 변형되거나 변형되지 않은 RNA를 전달하는 방법

[0742] 렌티바이러스로 형질도입된 K562 세포의 경우, 트랜스진에 함유된 에피토프 태그(HA 태그)의 발현은 프로바이러스 길이와 역비례 관계에 있으며, 약 6 kb보다 큰 프로바이러스 작제물에 대해 HA 태그를 발현하는 세포의 백분율이 약 1-log 감소한다(도 1 참조). 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 형질도입 효율에서의 감소에 대한 이유는 렌티바이러스 내에서 더 긴 프로바이러스 서열의 감소된 패키징 효율과 관련이 있는 것으로 생각된다. 3.6 kb 내지 8.2 kb 범위의 프로바이러스 길이의 렌티바이러스 작제물 세트를 시험하였다(도 2 참조). 생성된 렌티바이러스 입자의 수는 ELISA에 의해 측정된 p24 캡시드 단백질의 수를 이용하여 정량하였다. 프로바이러스 RNA 카피의 수는 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR)로 측정하였다. 표준화는 프로바이러스 길이의 함수로서 p24 캡시드 단백질 마이크로그램 당 RNA 카피의 정량화를 제공한다. 실험에서, 5kb 미만의 프로바이러스 길이에 대해, p24 마이크로그램 당 약 3×10^9 개의 RNA 카피가 관찰될 수 있었다. 6 kb 초과와 작제물에 대해, 바이러스 제조물은 p24 캡시드 마이크로그램 당 약 8×10^8 개 초과와 RNA 카피를 나타내지 않았다. 형질도입 효율에서의 감소를 초래하는 RNA-함유 바이러스 제조물과 RNA-결핍 바이러스 제조물 사이의 크기-의존적 차이가 관찰될 수 있다.

- [0743] 260V의 단일 펄스/녹색 형광 단백질(GFP)을 인코딩하는 mRNA를 갖는 150 μ F의 K562 세포 및 배양된 적혈구 세포(일차 세포로부터의 적혈구 세포)에 의한 전기천공을 수행하였다(도 3 참조). GFP로부터의 형광을 관독함으로써 성공적인 유전자 전달을 측정하였으며, 이는 mRNA가 세포로 진입한 후, 단백질로 번역되는 것을 필요로 한다. K562 세포의 성공적인 전기천공을 발생시키는 문헌으로부터의 조건(Van Tendeloo et al., Blood 2001 98(1):49-56)은 배양된 적혈구 세포(일차 전구세포로부터 유래됨)로의 외인성 핵산의 효과적인 전달에 불충분하다. 일차 전구세포로부터의 배양된 적혈구 세포의 전기천공을 위한 50개를 초과하는 상이한 조건을 시험하였다. 형질감염 효율은 일반적으로 0.1%의 형질감염 세포 내지 85% 초과인 형질감염 세포의 범위였다(도 4a 내지 4c 참조). 도 4a 내지 도 4c는 12개의 상이한 조건에 대한 분화 8일에서 일차 전구세포로부터의 배양된 적혈구 세포의 전기천공 후의 mRNA로부터의 GFP의 번역을 제시한다. 생활력을 Life Technologies로부터의 LIVE/DEAD 염색을 이용하여 측정하였으며, 염색에 대해 음성인 세포를 생존 가능한 것으로 간주하였다. 조건 1은 형질감염되지 않은 대조군(0.21% GFP, 97.39% 생활력)에 해당한다. 이용된 전기천공 조건에 따라, 세포는 조건 2에서와 같이 mRNA의 매우 우수한 흡수(86.9%) 및 높은 생활력(92.6%)을 가졌으나, 조건 9에서와 같이 mRNA의 불량한 흡수(30.9%) 및 불량한 생활력(42.7%)을 가졌다.
- [0744] 세포가 계속 분화함에 따라, 높은 생활력을 유지하면서 우수한 트랜스진 흡수 및 발현을 달성하기 위해 상이한 전기천공 조건이 요구된다. 우수한 형질감염 및 우수한 생활력에 도움이 되는 조건을 확인하기 위해 약 20일의 분화 배양 과정에 걸쳐 50개 초과인 조건을 세포에 대해 시험하였다. 도 5는 3개의 상이한 시점인 8일, 13일, 및 15일에서의 전기천공에 의한 GFP mRNA를 이용한 세포의 성공적인 형질감염을 제시한다. 적합한 조건은 표 5 내지 7에 요약되어 있다. 배양된 적혈구 세포를 또한 분화 10일 및 12일에서 전기천공에 의해 GFP mRNA를 이용하여 형질감염시켜 GFP 발현을 발생시켰다(데이터는 제시하지 않음).
- [0745] 일차 전구세포로부터 배양된 적혈구 세포의 본원에 개시된 조건하에서의 전기천공은 말단 분화하는 세포의 능력을 손상시키는 것을 나타내지 않은 것으로 또한 관찰되었다. 1회 전기천공된 세포를 재-전기천공하였고, 다시 트랜스진을 성공적으로 흡수하였고, 이를 번역하였다. 도 6은 9일째에 전기천공된 후(이는 4일 동안 분열하는 것을 가능하게 하며, 그 동안 GFP 형광의 양은 감소하였고, 이는 세포 분열을 통한 mRNA 및 단백질의 희석으로 인한 것일 수 있음), 13일째에 재-전기천공된 일차 전구세포로부터 배양된 적혈구 세포의 집단을 제시한다.
- [0746] 배양된 적혈구 세포를 세포가 비교적 미분화되는 확장 단계 동안인 분화 4일째에 GFP mRNA로 전기천공하였다. 분화 8일째에, 세포는 표 8에 제시된 바와 같이 7AAD 염색에 의한 GFP 형광 및 높은 생활력을 나타내었다. 표 8에서, P1은 세포를 구성하는 주요 집단의 백분율을 나타내고(예를 들어, 높은 P1 값은 조직과편의 낮은 수준을 의미함); % GFP는 GFP 형광을 나타내는 P1의 세포의 백분율을 나타내고, MFI는 GFP+ 세포의 평균 형광 강도이고, %AAD-는 AAD 음성인 세포의 백분율을 나타내고, 여기서 생존 가능한 세포는 AAD 음성이다.
- [0747] 실시예 2: ELISA
- [0748] P24 단백질을 제조업체의 프로토콜에 따라 상업적 키트(Clontech)를 이용하여 정량하였다. 간단히, 바이러스 상층액을 20 μ l 용해 완충액을 갖는 튜브에 분배하고, 60분 동안 37°C에서 인큐베이션한 후, 미세역가 플레이트로 옮겼다. 미세역가 플레이트를 세척하고, 60분 동안 37°C에서 100 μ l의 항-p24(비오틴 컨주게이트) 검출기 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트를 30분 동안 실온에서 100 μ l의 스트렙타비딘-HRP 컨주게이트와 함께 인큐베이션한 후, 다시 세척하였다. 기질 용액을 플레이트에 첨가하고, 20(\pm 2)분 동안 실온(18 내지 25°C)에서 인큐베이션하였다. 반응을 정지 용액으로 정지시키고, 비색 관독을 450 nm에서의 흡광도로 검출하였다.
- [0749] 실시예 3: qPCR
- [0750] 바이러스 RNA 카피를 제조업체의 프로토콜에 따라 상업적 렌티벡터 qRT-PCR 키트(Clontech)를 이용하여 정량하였다. 간단히, 렌티바이러스 상층액으로부터 RNA를 추출하기 위해 RNA 바이러스 정제 키트를 사용하였다. 바이러스 유전체 상의 보존 서열을 인지하고, 벡터에 의해 인코딩된 특정 트랜스진에 의존하지 않는 표준 렌티바이러스 프라이머(정방향 및 역방향)로 PCR 반응을 수행하였다. 42°C에서 5분 인큐베이션 후, 95°C에서 10초 인큐베이션 후, 40주기의 95°C에서 5초 및 60°C에서 30초로 RT 반응을 수행하였다. 사용된 기계는 Life Technologies QuantStudio였다.
- [0751] 실시예 4: 시험관 내 전사에 의한 mRNA의 생성
- [0752] mRNA의 시험관 내 생성을 위한 키트는, 예를 들어, Life Technologies MAxiscript T7 키트로부터 상업적으로 이용 가능하다. 간단히, 관심 유전자를 표준 분자생물학 기술에 의해 적절한 T7 프로모터-함유 플라스미드 DNA

로 클로닝한다. 전사 반응은 20 μ l의 전체 부피로 1 μ g의 DNA 주형, 2 μ l의 10x 전사 완충액, 1 μ l의 각각의 10 mM ATP, CTP, GTP, 및 UTP, 2 μ l의 T7 중합효소 효소 믹스로 설정한다. 반응물을 충분히 혼합하고, 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션한다. 오염된 잔여 플라스미드 DNA를 제거하기 위해, 1 μ l의 turbo DNase를 첨가하고, 반응물을 37°C에서 15분 동안 인큐베이션한다. 1 μ l의 0.5 M EDTA의 첨가에 의해 반응을 중지시킨다. 전사물을 젤 전기영동 또는 회전 컬럼 정제로 정제한다.

[0753] 실시예 5: 전기천공

[0754] 세포를 RPMI 완충액으로 세척하고, 10 μ l의 전체 부피로 1×10^7 세포/ml의 밀도로 Life Technologies Neon 전기천공 기계에 로딩하고, 1000 V의 1 펄스, 50 ms 펄스 폭의 조건으로 전기천공하였다.

[0755] 실시예 6: 화학적으로 변형된 mRNA를 이용한 전기천공

[0756] GFP를 인코딩하는 화학적으로 변형된 mRNA를 TriLink로부터 구입하였다. RNA는 슈도-우리딘 및 5-메틸 시토신을 함유한다. 분화하는 적혈구 세포를 분화 4, 8, 10, 또는 12일째에 전기천공하였다. 시험된 모든 분화일, 및 시험된 상이한 전기천공 조건하에서, GFP 형광이 관찰되었다. 표 9는 세포가 4일째에 전기천공되고, 8일째에 관찰되는 경우에 관찰된 GFP 형광 수준을 나타낸다. 표 10은 세포가 12일째에 전기천공되고, 15일째에 관찰되는 경우에 관찰된 GFP 형광 수준을 나타낸다. GFP 형광이 또한 분화 8일 또는 10일째에 전기천공된 세포에서 관찰되었다(데이터는 제시하지 않음).

[0757] 세포 생활력 및 증식 능력을 트리판 블루 염색을 이용하여 전기천공된 세포에서 측정하였다. 세포를 변형되지 않은 GFP mRNA 또는 슈도-우리딘 및 5-메틸 시토신을 포함하는 TriLink 화학 변형 RNA를 이용하여 분화 8일째에 전기천공하였다. 9일째에, 변형되지 않은 RNA 및 변형된 RNA를 수용한 세포에서 GFP 형광이 관찰되었다(데이터는 제시하지 않음). 9일에서 또한, 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수, 및 세포 생활력을 측정하였다. 변형되지 않은 mRNA로 전기천공된 샘플에서, 살아 있는 세포의 수는 외인성 핵산을 첨가하지 않고 전기천공된 대조군 세포에서 살아 있는 세포의 수보다 낮았다(표 11 참조). 이러한 감소는 변형된 RNA가 사용된 경우에 부분적으로 역전되었다(표 11). 이는 변형되지 않은 RNA를 이용한 전기천공이 세포 성장 또는 생활력을 감소시킬 수 있고, 변형된 RNA의 사용이 성장 또는 생활력을 적어도 부분적으로 구제할 수 있음을 나타낸다.

[0758] 실시예 7: 이중성 비번역 영역

[0759] 적혈구 세포를 헤모글로빈 3' UTR 서열이 첨부된 시험관내 전사된 GFP mRNA("Hemo-GFP")로 전기천공하였다. mRNA는 화학적으로 변형되지 않았다. 이후, 세포를 전기천공 2일 후에 유세포분석으로 GFP 형광에 대해 검정하였다. 세포의 59.7%가 GFP-양성이었다. GFP-양성 세포의 평균 형광 강도는 35069 단위였다.

[0760] 실시예 8: 성숙 단계 동안의 mRNA 전기천공

[0761] 도 7a에 예시된 바와 같이, 적혈구 세포 분화는 확장(전체적으로 0 내지 5일에 해당하는 0 내지 5일의 확장), 분화(전체적으로 6 내지 14일에 해당하는 1 내지 9일의 분화), 및 성숙(전체적으로 15 내지 28일에 해당하는 1 내지 14일의 성숙)의 3개의 단계로 나뉘어질 수 있다. 확장은 초기 단계 배양물을 증폭시켜 임상 용량 요구사항을 충족하기 위한 비-분화 환경에서의 조절 전구 세포 분리 및 확장의 단계를 기재한다. 분화는 적혈구형성을 유도하고, 적혈구 세포 기능으로 분화시키기 위한 성장 인자 및 배지 첨가물의 사용을 기재한다. 성숙은 적혈구 세포가 이의 핵을 먼저 상실하고, 이어서 이의 미토콘드리아 및 리보솜 함유물을 상실하는 최종 단계를 나타낸다. 성숙 적혈구 세포는 새로운 mRNA 합성 또는 단백질 번역을 위한 능력을 갖지 않는다.

[0762] 적혈구 세포 분화를 시험관 내에서 수행하고, 세포를 상이한 시점에서 GFP mRNA로 전기천공하였다. 세포를 분화 9일(전체적으로 14일)에서 전기천공한 경우, GFP 발현이 초기에 관찰되었으나, 9일 실험의 과정에 걸쳐 감소하였다(도 7b). 세포를 성숙 7일(전체적으로 21일)에서 전기천공한 경우, GFP 발현이 9일 실험 과정 전체에 걸쳐 연장되었다(도 7c). 4개의 상이한 전기천공 프로토콜(P1 내지 P4) 하에서, 결과는 유사하였고, 이는 상기 효과가 전기천공 조건과 비교적 독립적이라는 것을 나타낸다.

[0763] 상기 후기 단계에서의 전기천공은 그래 왔던 것처럼 또한 잘 작동한 것이 놀라웠다. 스타인버그(Steinberg)의 문헌[Steinberg, M., Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, Cambridge University Press, 2001]에 인용된 바와 같이, 성인 적혈구 세포는 이의 가스 운반에서의 역할을 위해 합성 헤모글로빈을 갖도록 구성되며; 핵, 단백질 합성 능력, 및 이의 기능을 다양화하는 능력은 생물학적으로 경제적인 수단을 통한 헤모글로빈 운반의 궁극적 목적을 위해 버려졌다. 당 분야는 일반적으로 성숙을 적혈구 세포가 제핵되고, 리보솜 및 미토콘드리아를 제거하는 단계로 간주하였다. 리보솜 제거는 성숙 단계의 적혈

구 세포가 불량하게 전사되어, 이에 따라 새로운 단백질 합성을 할 수 없을 것이라는 예상을 하게 한다.

[0764] 따라서, 적어도 성숙 단계의 적혈구 세포 뿐만 아니라 분화 단계의 적혈구 세포가 트랜스제닉 mRNA를 번역할 수 있는 것이 놀라웠고, 성숙 단계의 적혈구 세포가 분화 단계의 적혈구 세포보다 더 지속된 수준의 트랜스제닉 단백질을 생성한 것이 더욱 더 놀라웠다. 이는 외부적으로 제공된 RNA로부터의 새로운 단백질 합성이 제핵 적혈구 세포에서 달성될 수 있는 전통적인 모델과 달리 적혈구 발달의 독특한 단계를 확인한다. 이는 후기 단계 적혈구 세포 생성물에서 안정적인 단백질 생성을 달성하기 위한 지금까지 공지되지 않은 경로를 확인한다.

[0765] 실시예 9: 전기천공의 시기

[0766] 성숙 조건하에서 적혈구 세포의 집단으로 리포터 단백질(GFP)을 인코딩하는 mRNA를 전기천공하기 위한 여러 상이한 시점을 시험하였다. 특히, 성숙 4, 5, 6, 및 7일째에 전기천공을 시험하였다. 세포를 전기천공 후 적어도 6일 동안 24시간마다 유세포분석에 의해 GFP 발현에 대해 검정하였다. 적합한 전기천공 조건은, 예를 들어, 본원의 실시예 1 및 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 국제 출원 W02016/183482호에 기재되어 있다.

[0767] 도 8a에 제시된 바와 같이, 모든 시점에서 전기천공된 세포가 연장된 GFP 발현을 발생시켰다. 그러나, M4 및 M5일에 전기천공된 세포는 M6 또는 M7에서 전기천공된 세포보다 GFP를 발현하는 세포의 더 높은 백분율을 발생시켰다. 이러한 실험은 트랜스진을 특히 발현시킬 수 있는 적혈구 세포 성숙의 기간(window)을 나타낸다. 도 8b는 시간 경과에 걸쳐 M4 또는 M5에서 형질감염된 세포에서 집단 내의 GFP 수준이 다소 감소하나; 이들 세포에서의 GFP 발현은 대조군 세포 및 이후 시점에서 전기천공된 세포에서의 GFP 발현보다 여전히 높은 것을 제시한다.

[0768] 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 상기 범위는 세포의 번역 기구가 아직 상실되지 않은 성숙에서 충분히 초기이나, 동시에 외인성 mRNA 및 인코딩된 단백질이 후속하는 세포 분열에 의해 과도하게 희석되지 않은 성숙에서 충분히 후기인 시점을 나타낼 수 있다. 이러한 범위는 실시예 10에 기재된 바와 같이 추가로 특성규명되었다.

[0769] 실시예 10: 성숙 적혈구 세포의 특성규명

[0770] 다음으로, 성숙 적혈구 세포를 이의 번역 활성 및 제핵 수준에 대해 여러 시점에서 특성규명하였다. 번역 활성을 쌍직교 비표준 아미노산 태깅, 또는 BONCAT으로 측정하였다. 적합한 BONCAT 검정은, 예를 들어, 문헌 [Hatzenpichler et al., "In situ visualization of newly synthesized proteins in environmental microbes using amino acid tagging and click chemistry" Environmental Microbiology (2014) 16(8), 2568-2590]에 기재되어 있다. 이러한 검정은 L-메티오닌에 대한 대응물인 비-표준 아미노산 L-아지도호모알라닌(AHA)의 생체 내 혼입 후, 클릭 화학에 의한 혼입된 AHA 세포 단백질의 형광 표지화를 기초로 한다. 이러한 프로토콜은 AHA 농도를 1mM에서 2mM로 증가시키고, 인큐베이션 시간을 3시간으로 최적화시킴으로써 포유동물 일차 세포, 특히 인간 적혈구 전구세포에 대해 변형되고 최적화되었으며, 젤 전기영동 및 적외선 영상화에 의해 분석되는 구리-비함유 클릭 화학을 가능하게 하는 디벤조사이클로옥탄 기(DBCO)가 사용되었다. 적혈구 세포의 집단을 확장, 분화, 및 성숙 조건에 노출시켰고, 3×10^6 개의 세포의 샘플을 M3, M5, M7, M9, M11, M15, 및 M16일에 수거하였다. 도 9에 제시된 바와 같이, 세포의 번역 활성은 시간 경과에 걸쳐 급격하게 감소하였고, 이는 적혈구 세포가 번역 기구를 상실한 것을 나타낸다. 동일 시간 경과에 걸쳐, 집단 내의 제핵 세포의 비율은 급격히 상승하였다.

[0771] 세포 표면 마커를 또한 유세포분석에 의해 성숙의 상이한 단계에서 적혈구 세포에서 검정하였다. 표 13에 제시된 바와 같이, GPA-양성 세포 및 Band3-양성 세포의 백분율은 성숙 동안 상승하였고, Alpha4 인테그린-양성의 백분율은 시간 경과 전체에 걸쳐 높게 유지되었다.

[0772] 실시예 11: 전기천공된 적혈구 세포에서 단백질 발현을 증가시키는 리보뉴클레아제 억제제

[0773] 본 실험은 리보뉴클레아제 억제제에 적혈구 세포를 노출시키는 것이 트랜스진의 발현을 증가시키는 것을 입증한다.

[0774] 적혈구 세포를 분화시키고, 성숙 조건에 노출시키고, 리포터 유전자(mCherry)를 인코딩하는 mRNA로 M4일에 전기천공하였다. 2×10^6 개의 세포를 RNasin으로 처리한 후, mRNA를 0.5 U/ μ l, 1 U/ μ l, 또는 2 U/ μ l의 수준으로 세포에 첨가하거나, 대조군으로서 RNasin을 처리하지 않았다. 전기천공되지 않은 대조군을 또한 포함하였다. 세포를 M5, M7, M9, 및 M11일에 검정하였다. 도 10에 제시된 바와 같이, mCherry를 발현하는 세포의 백분율은 특히 M11 시점에서 RNasin이 처리되지 않은 세포보다 RNasin이 처리된 세포에서 더 높았다. RNasin 처리는 세포 생활력 또는 제핵에 부정적인 영향을 미치지 않았다(데이터는 제시하지 않음).

[0775] 실시예 12: 전기천공된 적혈구 세포에서 단백질 발현을 증가시키는 프로테아솜 억제제

[0776] 본 실험은 프로테아제 억제제에 적혈구 세포를 노출시키는 것이 트랜스진의 발현을 증가시키는 것을 입증한다.

[0777] 적혈구 세포를 분화시키고, 성숙 조건에 노출시키고, 리포터 유전자(GFP)를 인코딩하는 mRNA로 M5일에 전기천공하였다. 세포를 M4, M5, 또는 M6일에 MG-132, 보르테조미드, 및 카르필조미드로부터 선택된 프로테아솜 억제제로 처리하였다. 모든 세포 샘플은 M7, M9, 및 M11일에 검정시 75%가 넘는 GFP-양성 세포의 높은 백분율을 발생시켰다(데이터는 제시하지 않음). 도 11에 제시된 바와 같이, 전기천공 전, 20S 프로테아솜 억제제, MG-132 또는 보르테조미드를 이용한 처리는 하나 이상의 시점에서 GFP의 증가된 효과적인 발현을 발생시켰다. 보르테조미드 처리는 프로테아솜 억제제로 처리되지 않은 세포에 비해 GFP의 효과적인 발현에서 4배의 증가를 발생시켰다. 전기천공 전 20S 프로테아솜 억제제를 이용한 처리는 또한 정상 제핵을 발생시켰다(데이터는 제시하지 않음).

[0778] 실시예 13: 2개 이상의 RNA의 공동-발현

[0779] 본 실시예는 적혈구 세포에서의 2개 이상의 mRNA의 공동-발현을 입증한다.

[0780] 첫째로, 적혈구 세포를 EGFP mRNA 단독(표 14, 첫 번째 데이터 열), mCherry mRNA 단독(표 14, 두 번째 데이터 열), 또는 둘 모두의 mRNA(표 14, 세 번째 데이터 열)로 M5일에 전기천공하였다. EGFP 및 mCherry 형광을 M6, M11, M13, 및 M18일에 유세포분석으로 검정하였다. EGFP 및 mCherry 둘 모두를 발현하는 세포의 백분율은 시점 전체에 걸쳐 시종일관 높았으며(66.05% 내지 86.55%), mRNA 중 단지 하나를 이용한 전기천공 후에 형광을 발하는 세포의 백분율과 동등하였다. 본 실험은 2개의 mRNA의 균일한 발현을 동시에 달성하는 것이 가능함을 나타낸다.

[0781] 발현 수준을 또한 검정하였다. M13일에, mCherry mRNA 단독으로 전기천공된 세포에서의 mCherry의 효과적인 발현은 117이었고, mCherry mRNA 및 EGFP mRNA 둘 모두로 전기천공된 세포에서의 mCherry의 효과적인 발현은 85였다. EGFP mRNA 단독으로 전기천공된 세포에서의 EGFP의 효과적인 발현은 219였고, mCherry mRNA 및 EGFP mRNA 둘 모두로 전기천공된 세포에서의 EGFP의 효과적인 발현은 201이었다. 따라서, 발현 수준은 1개 또는 2개의 mRNA로 전기천공된 세포에서 유사하였다.

[0782] 생활력은 mRNA 단독으로 전기천공된 세포에서보다 2개의 mRNA로 공동-전기천공된 세포에서 더 낮지 않았다(데이터는 제시하지 않음).

[0783] HA-태깅된 m4-1BBL 및 FLAG-태깅된 아벨루맙(Avelumab)을 인코딩하는 mRNA의 또 다른 쌍을 적혈구 세포에서 공동-발현시켰다. RNA를 0.6 또는 0.8 mg/ml mRNA의 농도로 분화 6일(D6) 또는 분화 7일(D7)에 25×10^6 개의 적혈구 세포에 첨가하였다. 외인성 단백질을 항-HA 항체 및 항-FLAG 항체를 이용하여 유세포분석에 의해 검출하였다. 표 15에 제시된 바와 같이, 단백질의 공동-발현은 58.5%의 세포에서 달성되었고, 이는 mRNA 중 하나만으로 전기천공된 샘플에서 단백질 단백을 발현한 세포의 수와 동등하다.

[0784] 실시예 14: 용량-발현 연구

[0785] 본 실험은 소정량의 외인성 단백질이 적혈구 세포의 집단과 소정량의 외인성 단백질을 인코딩하는 mRNA를 접촉 시킴으로써 생성될 수 있음을 입증한다.

[0786] 성숙 4일에서 5×10^6 개의 세포를 상이한 양의 mRNA(샘플 당 0.0025 내지 0.6 μ g의 RNA)와 접촉시키고, 전기천공하였다. 단백질 발현을 전기천공 24시간 후에 검정하였다. 외인성 단백질을 항-HA 항체를 이용하여 유세포분석으로 정량하였다. 세포 당 단백질의 평균 수를 계산하였고, 이는 표 16에 제시된다. 외인성 단백질을 발현하는 세포의 백분율이 또한 표 16에 제시된다. 특히, 시험된 모든 mRNA 수준에서, 외인성 단백질을 발현하는 세포의 백분율은 높다. 그러나, 세포 당 카피의 수는 사용되는 mRNA의 양에 따라 대략 선형으로 증가한다. 따라서, 세포 집단 전체에 걸쳐 균일한 발현을 유지하면서 적절한 mRNA를 선택함으로써 원하는 단백질 발현의 양이 획득될 수 있다.

[0787] 실시예 15: 변형된 RNA로부터의 발현

[0788] 5' 캡(ARCA), polyA 꼬리, 및 슈도우리딘 중 하나 이상을 포함하는 변형된 mRNA를 생성하였다. mRNA는 번역을 촉진하기 위한 IRES, 검출을 촉진하기 위한 HA-인코딩 영역, 및 GFP 및 PAL(페닐알라닌 암모니아 분해효소)의 융합체를 인코딩하는 영역을 포함한다. mRNA를 M4일에 전기천공에 의해 적혈구 세포로 도입하고, M5(24시간 후), M6, M7, 및 M10일에 분석하였다. GFP 발현을 유세포분석으로 측정하였다. 도 12에 제시된 바와 같이, 슈도

우리딘 mRNA를 발현하는 세포는 완전히 변형되지 않은 RNA를 발현하는 세포보다 GFP-양성 세포의 더 높은 백분율을 가졌다. polyA 꼬리 및 캡의 첨가는 GFP-양성 세포의 백분율을 추가로 증가시켰다. 최종적으로, GFP 리포터의 발현을 나타내는 세포의 백분율은 캡, poly-A 꼬리, 및 슈도우리딘 혼입을 갖는 mRNA와 접촉된 세포에서 가장 높았다.

[0789] 표

[0790] [표 1]

[0791] 변형된 뉴클레오티드

5-아자-우리딘 2-티오-5-아자-미딘 2-티오우리딘 4-티오-슈도우리딘 2-티오-슈도우리딘 5-하이드록시우리딘 3-메틸우리딘 5-카르복시메틸-우리딘 1-카르복시메틸-슈도우리딘 5-프로피닐-우리딘 1-프로피닐-슈도우리딘 5-타우리노메틸우리딘 1-타우리노메틸-슈도우리딘 5-타우리노메틸-2-티오-우리딘 1-타우리노메틸-4-티오-우리딘 5-메틸-우리딘 1-메틸-슈도우리딘 4-티오-1-메틸-슈도우리딘 2-티오-1-메틸-슈도우리딘 1-메틸-1-테아자-슈도우리딘 2-티오-1-메틸-1-테아자-슈도미딘 디하이드로우리딘 디하이드로슈도우리딘 2-티오-디하이드로미딘 2-티오-디하이드로슈도우리딘 2-메톡시우리딘 2-메톡시-4-티오-우리딘 4-메톡시-슈도우리딘 4-메톡시-2-티오-슈도우리딘 5-아자-시티딘 슈도이소시티딘 3-메틸-시티딘 N4-아세틸시티딘 5-포르밀시티딘 N4-메틸시티딘 5-하이드록시메틸시티딘 1-메틸-슈도이소시티딘 피롤로-시티딘 피롤로-슈도이소시티딘 2-티오-시티딘 2-티오-5-메틸-시티딘 4-티오-슈도이소시티딘 4-티오-1-메틸-슈도이소시티딘	N2-메틸-6-티오-구아노신 N2,N2-디메틸-6-티오-구아노신 피리딘-4-온 리보뉴클레오시드 2-티오-5-아자-우리딘 2-티오미딘 4-티오-슈도미딘 2-티오-슈도위딘 3-메틸미딘 1-프로피닐-슈도미딘 1-메틸-1-테아자-슈도미딘 2-티오-1-메틸-1-테아자-슈도우리딘 4-메톡시-슈도미딘 5'-O-(1-티오포스페이트)-아데노신 5'-O-(1-티오포스페이트)-시티딘 5'-O-(1-티오포스페이트)-구아노신 5'-O-(1-티오포스페이트)-우리딘 5'-O-(1-티오포스페이트)-슈도우리딘 2'-O-메틸-아데노신 2'-O-메틸-시티딘 2'-O-메틸-구아노신 2'-O-메틸-우리딘 2'-O-메틸-슈도우리딘 2'-O-메틸-이노신 2-메틸아데노신 2-메틸티오-N6-메틸아데노신 2-메틸티오-N6 이소펜테닐아데노신 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신 N6-메틸-N6-트레오닐카르바모일아데노신 N6-하이드록시노르발릴카르바모일아데노신 2-메틸티오-N6-하이드록시노르발릴카르바모일아데노신 2'-O-리보실아데노신 (포스페이트) 1,2'-O-디메틸이노신 5,2'-O-디메틸시티딘 N4-아세틸-2'-O-메틸시티딘 리시딘 7-메틸구아노신 N2,2'-O-디메틸구아노신 N2,N2,2'-O-트리메틸구아노신 2'-O-리보실구아노신 (포스페이트) 위부토신 피옥시위부토신
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

[0792]

<p>4-티오-1-메틸-1-테아자-슈도이소시티딘 1-메틸-1-테아자-슈도이소시티딘 제불라린 5-아자-제불라린 5-메틸-제불라린 5-아자-2-티오-제불라린 2-티오-제불라린 2-메톡시-시티딘 2-메톡시-5-메틸-시티딘 4-메톡시-슈도이소시티딘 4-메톡시-1-메틸-슈도이소시티딘 2-아미노퓨린 2,6-디아미노퓨린 7-테아자-아데닌 7-테아자-8-아자-아데닌 7-테아자-2-아미노퓨린 7-테아자-8-아자-2-아미노퓨린 7-테아자-2,6-디아미노퓨린 7-테아자-8-아자-2,6-디아미노퓨린 1-메틸아데노신 N6-이소펜테닐아데노신 N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신 2-메틸티오-N6-(시스-하이드록시이소펜테닐)아데노신 N6-글리시닐카르바모일아데노신 N6-트레오닐카르바모일아데노신 2-메틸티오-N6-트레오닐카르바모일아데노신 N6,N6-디메틸아데노신 7-메틸아데닌 2-메틸티오-아데닌 2-메톡시-아데닌 이노신 1-메틸-이노신 위오신 위부토신 7-테아자-구아노신 7-테아자-8-아자-구아노신 6-티오-구아노신 6-티오-7-테아자-구아노신 6-티오-7-테아자-8-아자-구아노신 7-메틸-구아노신 6-티오-7-메틸-구아노신 7-메틸이노신 6-메톡시-구아노신 1-메틸구아노신</p>	<p>하이드록시위부토신 미변형(undermodified) 하이드록시위부토신 메틸위오신 퀘우오신 에폭시퀘우오신 갈락토실-퀘우오신 만노실-퀘우오신 7-시아노-7-테아자구아노신 7-아미노메틸-7-테아자구아노신 아르카에오신 5,2'-O-디메틸우리딘 4-티오우리딘 5-메틸-2-티오우리딘 2-티오-2'-O-메틸우리딘 3-(3-아미노-3-카르복시프로필)우리딘 5-메톡시우리딘 우리딘 5-옥시아세트산 우리딘 5-옥시아세트산 메틸 에스테르 5-(카르복시하이드록시메틸)우리딘) 5-(카르복시하이드록시메틸)우리딘 메틸 에스테르 5-메톡시카르보닐메틸우리딘 5-메톡시카르보닐메틸-2'-O-메틸우리딘 5-메톡시카르보닐메틸-2-티오우리딘 5-아미노메틸-2-티오우리딘 5-메틸아미노메틸우리딘 5-메틸아미노메틸-2-티오우리딘 5-메틸아미노메틸-2-셀레노우리딘 5-카르바모일메틸우리딘 5-카르바모일메틸-2'-O-메틸우리딘 5-카르복시메틸아미노메틸우리딘 5-카르복시메틸아미노메틸-2'-O-메틸우리딘 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘 N4,2'-O-디메틸시티딘 5-카르복시메틸우리딘 N6,2'-O-디메틸아데노신 N,N6,O-2'-트리메틸아데노신 N2,7-디메틸구아노신 N2,N2,7-트리메틸구아노신 3,2'-O-디메틸우리딘 5-메틸디하이드로우리딘 5-포르밀-2'-O-메틸시티딘 1,2'-O-디메틸구아노신 4-데메틸위오신 이소위오신 N6-아세틸아데노신</p>
<p>N2-메틸구아노신 N2,N2-디메틸구아노신 8-옥소-구아노신 7-메틸-8-옥소-구아노신 1-메틸-6-티오-구아노신</p>	

[0793]

[0794]

[0795]

[표 2]

[0796] 백본 변형

2'-O-메틸 백본
 펩티드 핵산 (PNA) 백본
 포스포로티오에이트 백본
 모르폴리노 백본
 카르바메이트 백본
 실록산 백본
 실과이드 백본
 설폭시드 백본
 설폰 백본
 포름아세틸 백본
 티오포름아세틸 백본
 메틸렌포름아세틸 백본
 리보아세틸 백본
 알켄 함유 백본
 설과메이트 백본
 설포데이트 백본
 설폰아미드 백본
 메틸렌이미노 백본
 메틸렌하이드라지노 백본
 아미드 백본

[0797]

[0798] [표 3]

[0799] 변형된 캡

m7GpppA
 m7GpppC
 m2,7GpppG
 m2,2,7GpppG
 m7Gpppm7G
 m7,2'OmeGpppG
 m7,2'dGpppG
 m7,3'OmeGpppG
 m7,3'dGpppG
 GppppG
 m7GppppG
 m7GppppA
 m7GppppC
 m2,7GppppG
 m2,2,7GppppG
 m7Gppppm7G
 m7,2'OmeGppppG
 m7,2'dGppppG
 m7,3'OmeGppppG
 m7,3'dGppppG

[0800]

[0801] [표 4]

[0802] 선택된 질병, 수용자 및 표적

범주	질병	외인성 폴리펩티드	표적
아밀로이드 증	AA 아밀로이드증	혈청 아밀로이드 A 단백질 또는 혈청 아밀로이드 P 성분에 대한 항체-유사 결합제	혈청 아밀로이드 A 단백질 및 아밀로이드 플라크
아밀로이드 증	베타 2 마이크로글로불린 아밀로이드증	베타-2 마이크로글로불린 또는 혈청 아밀로이드 P 성분에 대한 항체-유사 결합제	베타 2 마이크로글로불린 또는 아밀로이드 플라크
아밀로이드 증	경쇄 아밀로이드증	경쇄, 혈청 아밀로이드 P 성분에 대한 항체-유사 결합제	항체 경쇄 또는 이밀로이드 플라크
세포 청소	암	CD44에 대한 항체-유사 결합제	순환 종양 세포
세포 청소	암	EpCam에 대한 항체-유사 결합제	순환 종양 세포
세포 청소	암	Her2에 대한 항체-유사 결합제	순환 종양 세포
세포 청소	암	EGFR에 대한 항체-유사 결합제	순환 종양 세포
세포 청소	암 (B 세포)	CD20에 대한 항체-유사 결합제	암성 B 세포
세포 청소	암 (B 세포)	CD19에 대한 항체-유사 결합제	암성 B 세포
청소 Ab	항인지질 증후군	베타 2-당단백질-1	베타 2-당단백질-1에 대한 병원성 자가-항체
청소 Ab	파국 항인지질 증후군	베타 2-당단백질-1	베타 2-당단백질-1에 대한 병원성 자가-항체
청소 Ab	저응집병	I/i 항원	I/i 항원에 대한 병원성 자가-항체
청소 Ab	굿파스처 증후군	콜라겐 (IV)의 a3 NC1 도메인	콜라겐 (IV)의 a3 NC1 도메인에 대한 병원성 자가-항체
청소 Ab	면역 혈소판감소 자색반	혈소판 당단백질 (Ib-IX, IIb-IIIa, IV, Ia-IIa)	혈소판 당단백질에 대한 병원성 자가-항체
청소 Ab	막성 신장병증	포스포리파제 A2 수용체	포스포리파제 A2 수용체에 대한 병원성 자가-항체
청소 Ab	온난 항체 용혈성 빈혈	글리코포린 A, 글리코포린 B, 및/또는 글리코포린 C, Rh 항원	글리코포린 및/또는 Rh 항원에 대한 병원성 자가-항체

[0803]

보체	연령-관련 황반 변성	적합한 보체 조절 단백질	활성 보체
보체	비정형 용혈성 요독 증후군	보체 인자 H, 또는 적합한 보체 조절 단백질	활성 보체
보체	자가면역 용혈성 빈혈	적합한 보체 조절 분자	활성 보체
보체	보체 인자 I 결핍	보체 인자 I, 적합한 보체 조절 단백질	활성 보체
보체	비-알콜성 지방간염	적합한 보체 조절 분자	활성 보체
보체	발작성 야간 헤모글로빈뇨	적합한 보체 조절 단백질	활성 보체
효소	3-메틸크로토닐-CoA 카르복실라제 결핍	3-메틸크로토닐-CoA 카르복실라제	3-하이드록시발레릴카르니틴, 3-메틸크로토닐글리신(3-MCG) 및 3-하이드록시이소발레르산(3-HIVA)
효소	급성 간헐 포르피린증	포르포빌리노겐 데아미나제	포르포빌리노겐
효소	급성 림프모구 백혈병	아스파라기나제	아스파라긴
효소	급성 림프구 백혈병, 급성 골수성 백혈병	아스파라기나제	아스파라긴
효소	급성 골수세포성 백혈병	아스파라기나제	아스파라긴
효소	아데닌 포스포리보실트랜스페라제 결핍	아데닌 포스포리보실트랜스페라제	불용성 퓨린 2,8-디하이드록시아데닌
효소	아데노신 데아미나제 결핍	아데노신 데아미나제	아데노신
효소	무성요소원혈증	FI	효소 대체
효소	알콜 중독	알콜 데하이드로게나제/산화효소	에탄올
효소	알렉산더병	FVII	효소 대체
효소	알칼톤뇨증	호모겐티세이트 산화효소	호모겐티세이트
효소	아르기닌혈증	암모니아 모노옥시게나제	암모니아
효소	아르기니노숙시네이트 산뇨	암모니아 모노옥시게나제	암모니아
효소	시트룰린혈증 타입 I	암모니아 모노옥시게나제	암모니아
효소	시트룰린혈증 타입 II	암모니아 모노옥시게나제	암모니아
효소	완전 LCAT 결핍, 어안병, 축상경화증, 고콜레스테롤혈증	레시틴-콜레스테롤 아실트랜스페라제(LCAT)	콜레스테롤
효소	시아니드 중독	티오설파이트-시아니드 설퍼트랜스페라제	시아니드

[0804]

효소	당뇨병	헥소키나제, 글루코키나제	글루코스
효소	인자 II 결핍	FII	효소 대체
효소	가족 고아르기닌혈증	아르기나제	아르기닌
효소	피브리린 안정화 인자 결핍	FXIII	효소 대체
효소	글루타르산혈증 타입 I	리신 산화효소	3-하이드록시글루타르산 및 글루타르산(C5-DC), 리신
효소	통풍	요산분해효소	요산
효소	통풍 - 고요산혈증	요산분해효소	요산(요산염 결정)
효소	하계만 결핍	FXII	효소 대체
효소	피리미딘 5' 뉴클레오티다제 결핍으로 인한 용혈 빈혈	피리미딘 5' 뉴클레오티다제	피리미딘
효소	혈우병 A	인자 VIII	트롬빈(인자 II a) 또는 인자 X
효소	혈우병 B	인자 IX	인자 XIa 또는 인자 X
효소	혈우병 C	FXI	효소 대체
효소	간세포 암종, 흑색종	아르기닌 데이미나제	아르기닌
효소	호모시스테인뇨증	시스타티오닌 B 신타제	호모시스테인
효소	고암모니아혈증/오르니틴혈증/시트룰린혈증(오르니틴 운반체 결함)	암모니아 모노옥시게나제	암모니아
효소	이소발레르산혈증	류신 대사 효소	류신
효소	납중독	d-아미노레블리네이트 데하이드로게나제	납
효소	레슈-니한 증후군	요산분해효소	요산
효소	단풍시럽뇨병	류신 대사 효소	류신
효소	메틸말론산증(비타민 b12 비-반응성)	메틸말로닐-CoA 뮤타제	메틸말로네이트
효소	미토콘드리아 신경위장 뇌병증	티미딘 포스포릴라제	티민
효소	미토콘드리아 신경위장 뇌병증 (MNGIE)	티미딘 포스포릴라제	티민
효소	오렌병	FV	효소 대체
효소	p53-널(null) 고형 종양	세린 데하이드라타제 또는 세린 하이드록시메틸 트랜스페라제	세린
효소	척장 샘암종	아스파라기나제	아스파라긴

[0805]

효소	페닐케톤뇨증	페닐알라닌 하이드록실라제, 페닐알라닌 암모니아 리아제	페닐알라닌
효소	원발성 고옥살산뇨증	옥살레이트 산화효소	옥살레이트
효소	프로피온산증	프로피오네이트 전환 효소?	프로프리오닐 coA
효소	퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 결핍	퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제	이노신, dGTP
효소	스튜어트-파워 결핍	FX	효소 대체
효소	혈전성 혈소판감소자색반	ADAMTS13	초-거대 폰 빌레브란트 인자(ULVWF)
효소	트랜스페라제 결핍성 갈락토스혈증(갈락토스혈증 타입 1)	갈락토스 데하이드로게나제	갈락토스-1-포스페이트
효소	티로신혈증 타입 1	티로신 페놀-리아제	티로신
효소	폰 빌레브란트병	vWF	효소 대체
IC 청소	IgA 신장병증	보체 수용체 1	면역 복합체
IC 청소	루푸스신장염	보체 수용체 1	면역 복합체
IC 청소	전신홍반루푸스	보체 수용체 1	면역 복합체
감염성	탄저병(B. 안트라시스) 감염	B. 안트라시스 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	B. 안트라시스
감염성	C. 보툴리눔 감염	C. 보툴리눔 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	C. 보툴리눔
감염성	C. 디피실레 감염	C. 디피실레 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	C. 디피실레
감염성	칸디다 감염	칸디다 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	칸디다
감염성	E. 콜리 감염	E. 콜리 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	E. 콜리
감염성	에볼라 감염	에볼라 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	에볼라
감염성	B형 간염(HBV) 감염	HBV 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	HBV
감염성	C형 간염(HCV) 감염	HCV 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	HCV
감염성	인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염	HIV 피막 단백질 또는 CD4 또는 CCR5에 대한 항체-유사 결합제	HIV
감염성	M. 튜베르쿨로시스 감염	M. 튜베르쿨로시스 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	M. 튜베르쿨로시스
감염성	말라리아(P. 팔시파룸) 감염	P. 팔시파룸 표면 단백질에 대한 항체-유사 결합제	P. 팔시파룸
지질	간 리파제 결핍, 고콜레스테롤혈증	간 리파제(LIPC)	지질단백질, 중간 밀도(IDL)
지질	고알파지질단백혈증 1	콜레스테릴 에스테르 전달 단백질(CETP)	지질단백질, 고밀도(HDL)
지질	고콜레스테롤혈증	저밀도 지질단백질(LDL)에 대한 항체-유사 결합제, LDL 수용체	LDL

[0806]

지질	고콜레스테롤혈증	고밀도 지질단백질(HDL)에 대한 항체-유사 결합제, HDL 수용체	HDL
지질	지질단백질 리파제 결핍	지질단백질 리파제	킬로미크론 및 초저밀도 지질단백질(VLDL)
지질	지질단백질 리파제 결핍, 지질단백질 대사 장애	지질단백질 리파제(LPL)	지질단백질, 초저밀도(VLDL)
리소좀 축적	아스파틸글루코사민뇨 (208400)	N-아스파틸글루코사미니다제	당단백질
리소좀 축적	뇌힘줄황색종증(콜레스타놀 지질증; 213700)	스테롤 27-하이드록실라제	지질, 콜레스테롤, 및 담즙산
리소좀 축적	지방갈색소증 성인 형태(CLN4, 쿠프스병; 204300)	팔미토일-단백질 티오에스테라제-1	리포피그먼트(lipopigment)
리소좀 축적	세로이드 지방갈색소증 유아 형태(CLN1, 산타부오리-할티아병; 256730)	팔미토일-단백질 티오에스테라제-1	리포피그먼트
리소좀 축적	세로이드 지방갈색소증 유아 형태(CLN3, 바텐병, 보그트-스필마이아병; 204200)	리소좀 막횡단 CLN3 단백질	리포피그먼트
리소좀 축적	세로이드 지방갈색소증 후기 유아 형태(CLN2, 안스키-빌쇼스키병; 204500)	리소좀 펌스타틴-둔감성 펌티다제	리포피그먼트
리소좀 축적	지적 장애를 갖는 세로이드 지방갈색소증 진행성 간질(600143)	막횡단 CLN8 단백질	리포피그먼트
리소좀 축적	세로이드 지방갈색소증 변형 후기 유아 형태(CLN6; 601780)	막횡단 CLN6 단백질	리포피그먼트
리소좀 축적	세로이드 지방갈색소증 변형 후기 유아 형태, 핀란드형(CLN5; 256731)	리소좀 막횡단 CLN5 단백질	리포피그먼트
리소좀 축적	콜레스테릴 에스테르 축적병(CESD)	리소좀 산 리파제	지질 및 콜레스테롤
리소좀 축적	N-당화 CDG Ia 의 선천성 장애(전적으로 신경계 및 신경계-복합장기 형태; 212065)	포스포만노뮤타제-2	N-당화 단백질

[0807]

리소좀 축적	N-당화 CDG Ib 의 선천성 장애(602579)	만노스(Man) 포스페이트(P) 이성화효소	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG Ic 의 선천성 장애(603147)	돌리코-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-돌리콜 글루코실트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG Id 의 선천성 장애(601110)	돌리코-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-돌리콜 만노실트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG Ie 의 선천성 장애(608799)	돌리콜-P-만노스 신타제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG If 의 선천성 장애(609180)	만노스-P-돌리콜 활용과 관련된 단백질	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG Ig 의 선천성 장애(607143)	돌리킬-P-만노스:Man-7-GlcNAc-2-PP-돌리킬- α -6-만노실트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG Ih 의 선천성 장애(608104)	돌리킬-P-글루코스:Glc-1-Man-9-GlcNAc-2-PP-돌리킬- α -3-글루코실트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG Ii 의 선천성 장애(607906)	α -1,3-만노실트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG IIa 의 선천성 장애(212066)	만노실- α -1,6-당단백질- β -1,2-N-아세틸글루코스미닐트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG IIb 의 선천성 장애(606056)	글루코시다제 I	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG IIc 의 선천성 장애(람밤-하사론 증후군; 266265)	GDP-푸코스 전달체-1	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG II d 의 선천성 장애(607091)	β -1,4-갈락토실트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG IIe 의 선천성 장애(608779)	올리고머 골지 복합체-7	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG Ij 의 선천성 장애(608093)	UDP-GlcNAc:돌리킬-P NAcGlc 포스포트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG Ik 의 선천성 장애(608540)	β -1,4-만노실트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	N-당화 CDG II 의 선천성 장애(608776)	α -1,2-만노실트랜스페라제	N-당화 단백질

[0808]

리소좀 축적	N-당화의 선천성 장애, 타입 I(전-골지 당화 결함)	α -1,2-만노실트랜스페라제	N-당화 단백질
리소좀 축적	시스틴증	시스티노신(리소좀 시스틴 전달체)	시스테인
리소좀 축적	파브리병(301500)	트리헥소실세라미드 α -갈락토시다제	글로보트리아오실세라미드
리소좀 축적	파버병(지질육아종증; 228000)	세라미다제	지질
리소좀 축적	푸코시드축적증(230000)	α -L-푸코시다제	푸코스 및 복합 당
리소좀 축적	갈락토시알리도시스(골드버그 증후군, 복합 뉴라미니다제 및 β -갈락토시다제 결핍; 256540)	보호 단백질/카텝신 A(PPCA)	리소좀 함유물
리소좀 축적	고셔병	글루코실세라미드 β -글루코시다제	스핑고지질
리소좀 축적	글루타밀 리보스-5-포스페이트 축적증(305920)	ADP-리보스 단백질 하이드롤라제	글루타밀 리보스 5-포스페이트
리소좀 축적	글리코겐 축적증 타입 2(폼페병)	알파 글루코시다제	글리코겐
리소좀 축적	GM1 강글리오시드증, 전신성	강글리오시드 β -갈락토시다제	산성 지질 물질, 강글리오시드
리소좀 축적	GM2 활성화제 단백질 결핍(테이-삭스병 AB 변형, GM2A; 272750)	GM2 활성화제 단백질	강글리오시드
리소좀 축적	GM2 강글리오시드증	강글리오시드 β -갈락토시다제	강글리오시드
리소좀 축적	유아 시알산 축적 장애(269920)	Na 포스페이트 공동전달체, 시알린	시알산
리소좀 축적	크라베 병(245200)	갈락토실세라미드 β -갈락토시다제	스핑고지질
리소좀 축적	리소좀 산 리파제 결핍(278000)	리소좀 산 리파제	콜레스테릴 에스테르 및 트리글리세라이드
리소좀 축적	이염색백색질장애(250100)	아릴설파타제 A	설파티드
리소좀 축적	점액지질증 ML II (I-세포 병; 252500)	N-아세틸글루코사미널-1-포스포트랜스페라제 촉매 서브유닛	N-결합 당단백질
리소좀 축적	점액지질증 ML III(슈도-혈러 다발이상증)	N-아세틸글루코사미널-1 포스포트랜스페라제	N-결합 당단백질
리소좀 축적	점액지질증 ML III(슈도-혈러 다발이상증) 타입 III-A(252600)	촉매 서브유닛	N-결합 당단백질

[0809]

리소좀 축적	점액지질증 ML III(슈도-혈러 다발이상증) 타입 III-C(252605)	기질-인지 서브유닛	N-결합 당단백질
리소좀 축적	점액다당류증 MPS I H/S(혈러-샤이에 증후군; 607015)	α -1-이두로니다제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS I-H(혈러 증후군; 607014)	α -1-이두로니다제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS II(헌터 증후군; 309900)	이두로네이트 설페이트 설파타제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS III (산필리포 증후군) 타입 III-A(252900)	헤 파란-S-설페이트 설파미다제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS III (산필리포 증후군) 타입 III-B(252920)	N-아세틸-D-글루코사미니다제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS III (산필리포 증후군) 타입 III-C(252930)	아세틸-CoA-글루코사미니드 N-아세틸트랜스페라제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS III (산필리포 증후군) 타입 III-D(252940)	N-아세틸-글루코사미니드-6-설페이트 설파타제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS I-S(샤이에 증후군; 607016)	α -1-이두로니다제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS IV (모르키오 증후군) 타입 IV-A(253000)	갈락토사민-6-설페이트 설파타제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS IV (모르키오 증후군) 타입 IV-B(253010)	β -갈락토시다제	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS IX (히알루로니다제 결핍; 601492)	히알루로니다제 결핍	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS VI (마로토-라미 증후군; 253200)	N-아세틸 갈락토사민 α -4-설페이트 설파타제(아릴설파타제 B)	글리코사미노글리칸
리소좀 축적	점액다당류증 MPS VII (슬라이 증후군; 253220)	β -글루쿠로니다제	글리코사미노글리칸

[0810]

리소좀 축적	뮤코실파티도시스(다수의 설파타제 결핍; 272200)	설파타제-변형 인자-1	설파티드
리소좀 축적	니먼-픽병 타입 A	스핑고미엘리나제	스핑고미엘린
리소좀 축적	니먼-픽병 타입 B	스핑고미엘리나제	스핑고미엘린
리소좀 축적	니먼-픽병 타입 C1/타입 D ((257220)	NPC1 단백질	스핑고미엘린
리소좀 축적	니먼-픽병 타입 C2(607625)	에피디디탈 분비 단백질 1 (HE1; NPC2 단백질)	스핑고미엘린
리소좀 축적	프로사포신 결핍 (176801)	프로사포신	스핑고지질
리소좀 축적	피크노디스토시스 (265800)	카텝신 K	키닌
리소좀 축적	샌드호프병; 268800	β-헥소사미니다제 B	강글리오시드
리소좀 축적	사포신 B 결핍(설파티드 활성제 결핍)	사포신 B	스핑고지질
리소좀 축적	사포신 C 결핍 (고셔 활성제 결핍)	사포신 C	스핑고지질
리소좀 축적	신들러병 타입 I (유아 중증 형태; 609241)	N-아세틸-갈락토사미니다제	당단백질
리소좀 축적	신들러병 타입 II (칸자키병, 성인-발병 형태; 609242)	N-아세틸-갈락토사미니다제	당단백질
리소좀 축적	신들러병 타입 III (중간 형태; 609241)	N-아세틸-갈락토사미니다제	당단백질
리소좀 축적	시알산증 (256550)	뉴라미니다제 I(시알리다제)	점액다당류 및 점액지질
리소좀 축적	시알노증 핀란드 형태 (살라병; 604369)	Na 포스페이트 공동전달체, 시알린	시알산
리소좀 축적	시알노증 프랑스 형태 (269921)	UDP-N-아세틸글루코사민-2-에피머라제/N-아세틸만노사민 키나제, 시알린	시알산
리소좀 축적	스핑고지질증 타입 I (230500)	강글리오시드 β-갈락토시다제	스핑고지질
리소좀 축적	스핑고지질증 타입 II (유년기 타입; 230600)	강글리오시드 β-갈락토시다제	스핑고지질
리소좀 축적	스핑고지질증 타입 III (성인 타입; 230650)	강글리오시드 β-갈락토시다제	스핑고지질
리소좀 축적	테이-삭스병; 272800	β-헥소사미니다제 A	강글리오시드
리소좀 축적	원체스터 증후군 (277950)	금속단백분해효소-2	점액다당류

[0811]

리소좀 축적	울만병	리소좀 산 리파제	지질 및 콜레스테롤
리소좀 축적	α -만노시드증(248500), 타입 I(중증) 또는 II(경증)	α -D-만노시다제	탄수화물 및 당단백질
리소좀 축적	β -만노시드증 (248510)	β -D-만노시다제	탄수화물 및 당단백질
독성 분자	알파 응혈소 중독	알파 응혈소에 대한 항체-유사 결합제	알파 응혈소
독성 분자	탄저병 독소 중독	탄저병 독소에 대한 항체-유사 결합제	탄저병 독소
독성 분자	박테리아 독소-유도 쇼크	박테리아 독소에 대한 항체-유사 결합제	박테리아 독소
독성 분자	보툴리눔 독소 중독	보툴리눔 독소에 대한 항체-유사 결합제	보툴리눔 독소
독성 분자	혈색소증 (철 중독)	철 킬레이트제	분자 철
독성 분자	메탄올 중독	메탄올 데하이드로게나제	메탄올
독성 분자	신경 가스 중독	부티릴 콜린에스테라제	사린
독성 분자	PRP 에 의해 야기된 프리온병	프리온 단백질 PRP 에 대한 항체-유사 결합제	프리온 단백질 PRP
독성 분자	PRPc 에 의해 야기된 프리온병	프리온 단백질 PRPc 에 대한 항체-유사 결합제	프리온 단백질 PRPc
독성 분자	PRPsc 에 의해 야기된 프리온병	프리온 단백질 PRPsc 에 대한 항체-유사 결합제	프리온 단백질 PRPsc
독성 분자	PRPres 에 의해 야기된 프리온병	프리온 단백질 PRPres 에 대한 항체-유사 결합제	프리온 단백질 PRPres
독성 분자	패혈증 또는 사이토카인 폭풍	사이토카인 또는 케모카인의 더피 항원 수용체(DARC)에 대한 항체-유사 결합제	사이토카인
독성 분자	거미 독액 중독	거미 독액에 대한 항체-유사 결합제	거미 독액
독성 분자	윌슨병	구리 킬레이트제	분자 구리

[0812]

[0813]

[표 5]

[0814] 전기천공 조건 (8 내지 9일)

샘플	펄스 전압	펄스 폭	펄스 수	% GFP	세포 생활력
1	전기천공 없음			0.21	97.39
2	1400	20	1	86.9	92.6
3	1500	20	1	79.5	85.7
4	1600	20	1	68.2	78.5
5	1700	20	1	41.4	52.3
6	1100	30	1	79	96
7	1200	30	1	83.6	91.9
8	1300	30	1	77.6	86.6
9	1400	30	1	30.9	42.7
10	1000	40	1	65.3	92.4
11	1100	40	1	69.3	86.9
12	1200	40	1	65.8	79.9
13	1100	20	2	81.3	92.8
14	1200	20	2	82.1	91.2
15	1300	20	2	78.2	86.3
16	1400	20	2	79.3	88.1
17	850	30	2	32.4	95.9
18	950	30	2	59.5	93.8
19	1050	30	2	72	90.8
20	1150	30	2	74.8	84.8
21	1300	10	3	88.3	94.2
22	1400	10	3	88.7	93.3
23	1500	10	3	86.5	90.3
24	1600	10	3	83.3	87.7

[0815]

[0816] [표 6]

[0817] 전기천공 조건 (12 내지 13일)

샘플	펄스 전압	펄스 폭	펄스 수	% GFP	세포 생활력
1	전기천공 없음			0.58	96.7
2	1400	20	1	42.5	94.9
3	1500	20	1	54.8	91.8
4	1600	20	1	56.9	91.6
5	1700	20	1	61.5	88.7
6	1100	30	1	13.5	95.6
7	1200	30	1	29	95.5
8	1300	30	1	43.8	94.3
9	1400	30	1	44.5	92.9
10	1000	40	1	6.5	95.3
11	1100	40	1	21.7	94.8
12	1200	40	1	33.2	92.3
13	1100	20	2	18	95.8
14	1200	20	2	29.3	95.2
15	1300	20	2	42	94.5
16	1400	20	2	51.5	91.8
17	850	30	2	2.7	95.9
18	950	30	2	7.3	95.3
19	1050	30	2	13.5	94.5
20	1150	30	2	20.7	94.7
21	1300	10	3	27.3	95.9
22	1400	10	3	38.8	95.3
23	1500	10	3	55	94.1
24	1600	10	3	62.6	93.3

[0818]

[0819] [표 7]

[0820] 전기천공 조건 (14 내지 16일)

샘플	펄스 전압	펄스 폭	펄스 수	% GFP	세포 생활력
0	전기천공 없음			1.1	5.2
1	1700	20	1	44.7	7.7
2	1700	20	2	44.1	15.5
3	1700	20	3	42.7	25
4	1600	10	3	37.6	7.6
5	1600	10	6	34.9	19.1
6	1600	10	8	20.1	47.8
7	1600	20	1	36.7	5.7
8	1600	20	2	37.2	14.6
9	1600	20	3	40.2	13
10	1700	10	1	21.7	4.9
11	1700	10	2	43	9.7
12	1700	10	3	24.9	33.9

[0821]

[0822] [표 8]

[0823] 전기천공된 4일 세포의 GFP 형광.

	% P1	% GFP+ 세포	MFI	% AAD-
전기천공되지 않은 대조군	87.3	0.85	2,678	98.6
전기천공됨, 조건 A, 시험 1	79	91.6	121,279	98.6
전기천공됨, 조건 A, 시험 2	80.8	90.6	105,741	98.5
전기천공됨, 조건 B, 시험 1	83.5	58.8	25,482	98.4
전기천공됨, 조건 B, 시험 2	85.9	19.6	10,709	98.7
전기천공됨, 조건 C, 시험 1	87	35	17,086	98.7
전기천공됨, 조건 C, 시험 2	86.3	13.1	8,114	98.8

[0824]

[표 9]

[0826] 화학적으로 변형된 RNA로 전기천공된 4일 세포의 GFP 형광

	% P1	% GFP+ 세포	MFI	% AAD-
전기천공되지 않은 대조군	87.3	0.85	2,678	98.6
전기천공됨, 조건 A, 시험 1	87.2	96.6	75,393	98.0
전기천공됨, 조건 A, 시험 2	87.4	96.3	75,853	98.5
전기천공됨, 조건 B, 시험 1	88.4	60.8	23,097	98.9
전기천공됨, 조건 B, 시험 2	87.6	57.8	21,759	98.7
전기천공됨, 조건 C, 시험 1	88.7	61	24,857	98.8
전기천공됨, 조건 C, 시험 2	88.4	50.9	20,358	98.5

[0827]

[표 10]

[0829] 화학적으로 변형된 RNA로 전기천공된 12일 세포의 GFP 형광

	% P1	% GFP+ 세포	MFI	% AAD-
전기천공되지 않은 대조군	92.2	0.86	3,754	95
전기천공됨, 시험 1	93.7	55.2	22,748	98
전기천공됨, 시험 2	90.7	90	107,091	94

[0830]

[표 11]

[0832] 전기천공 후 트리판 블루 염색에 의한 세포 생활력 및 증식 능력의 평가

	8일 전체 세포(M)	9일 전체 세포(M)	9일 살아 있는 세포(M)	9일 세포 생활력
외인성 핵산 없이 전기천공됨	0.21	0.441	0.441	100
변형되지 않은 GFP mRNA, 1 ug으로 전기천공됨	0.2	0.376	0.37	99
변형되지 않은 GFP mRNA, 2 ug으로 전기천공됨	0.2	0.354	0.332	94
변형된 GFP mRNA, 1 ug으로 전기천공됨	0.2	0.414	0.381	92

[0833]

[표 12]

[0835] 인간 비코딩 RNA

A1BG-AS1 A2M-AS1 A2ML1-AS1 AADACL2-AS1 AATK-AS1 ABCA9-AS1 ABCC5-AS1 ABHD11-AS1
 ABHD14A-ACY1 ABHD15-AS1 ACAP2-IT1 ACTA2-AS1 ACTN1-AS1 ACVR2B-AS1 LOC100130964
 ADAMTS19-AS1 ADAMTS9-AS1 ADAMTS9-AS2 ADAMTSL4-AS1 ADARB2-AS1 ADD3-AS1 ADGRA1-
 AS1 ADGRL3-AS1 ADIPOQ-AS1 ADIRF-AS1 ADNP-AS1 ADORA2A-AS1 ADPGK-AS1 LOC104968398
 AFAP1-AS1 AFF2-IT1 AGAP1-IT1 AGAP2-AS1 AGBL1-AS1 AGBL4-IT1 AGBL5-AS1 AGPAT4-IT1 AKT3-
 IT1 ALDH1L1-AS1 ALDH1L1-AS2 ALG9-IT1 ALKBH3-AS1 ALMS1-IT1 ALOX12-AS1 APTR AMMECR1-
 IT1 ANKRD10-IT1 ANKRD33B-AS1 ANKRD34C-AS1 ANKRD44-IT1 ANO1-AS1 ANO1-AS2 ANP32A-IT1
 LOC280665 AIRN UCHILAS AOAH-IT1 AP4B1-AS1 APCDD1L-AS1 APOA1-AS APOBEC3B-AS1 APOC4-
 APOC2 AATBC ABALON AQP4-AS1 ARAP1-AS1 ARAP1-AS2 ARHGAP19-SLIT1 ARHGAP22-IT1
 ARHGAP26-AS1 ARHGAP26-IT1 ARHGAP31-AS1 ARHGAP5-AS1 ARHGEF19-AS1 ARHGEF26-AS1
 ARHGEF3-AS1 ARHGEF38-IT1 ARHGEF7-AS1 ARHGEF7-AS2 ARHGEF7-IT1 ARHGEF9-IT1 ARID4B-IT1
 ARL2-SNX15 ARMC2-AS1 ARNTL2-AS1 ARPP21-AS1 ARRDC1-AS1 ARRDC3-AS1 ARSD-AS1 ASAP1-IT1
 ASAP1-IT2 ASB16-AS1 ASH1L-AS1 ASMTL-AS1 ASTN2-AS1 ATE1-AS1 ATG10-AS1 ATG10-IT1 ATP11A-
 AS1 ATP13A4-AS1 ATP13A5-AS1 ATP1A1-AS1 ATP1B3-AS1 ATP2A1-AS1 ATP2B2-IT1 ATP2B2-IT2
 ATP6V0E2-AS1 ATP6V1B1-AS1 ATP6V1G2-DDX39B ATXN8OS AZIN1-AS1 LOC100506431 B3GALT5-AS1
 B4GALT1-AS1 B4GALT4-AS1 BAALC-AS1 BAALC-AS2 BACE1-AS BACE2-IT1 BACH1-IT2 BACH1-IT3
 BAIAP2-AS1 BARX1-AS1 BBOX1-AS1 BCDIN3D-AS1 BLACE BDNF-AS BEAN1-AS1 BGLT3 BHLHE40-
 AS1 BIN3-IT1 BIRC6-AS1 BIRC6-AS2 BLACAT1 BPESC1 BLOC1S1-RDH5 BLOC1S5-TXNDC5 BMP7-AS1
 BMPR1B-AS1 BOK-AS1 BOLA3-AS1 BANCRC BCYRN1 BRE-AS1 BCAR4 BREA2 BRWD1-AS1 BRWD1-IT2
 BSN-AS2 BISPR BTBD9-AS1 BVES-AS1 BZRAP1-AS1 C10orf32-ASMT C10orf71-AS1 C15orf59-AS1
 C1QTNF1-AS1 C1QTNF3-AMACR C1QTNF9-AS1 C1RL-AS1 C2-AS1 C20orf166-AS1 C21orf62-AS1
 C21orf91-OT1 C3orf67-AS1 C5orf66-AS1 C5orf66-AS2 C8orf34-AS1 C8orf37-AS1 C9orf135-AS1 C9orf173-
 AS1 C9orf41-AS1 CA3-AS1 CACNA1C-AS1 CACNA1C-AS2 CACNA1C-AS4 CACNA1C-IT1 CACNA1C-IT2
 CACNA1C-IT3 CACNA1G-AS1 CACNA2D3-AS1 CACTIN-AS1 CADM2-AS1 CADM2-AS2 CADM3-AS1
 CALML3-AS1 CAMTA1-IT1 CASC11 CASC15 CASC16 CASC17 CASC18 CASC19 CASC2 CASC20 CASC21
 CASC23 CASC6 CASC8 CASC9 CAPN10-AS1 CARD8-AS1 CARS-AS1 CASK-AS1 CECR3 CECR7 CATIP-
 AS1 CATIP-AS2 CATR1 CBR3-AS1 CCDC13-AS1 CCDC144NL-AS1 CCDC148-AS1 CCDC183-AS1 CCDC26
 CCDC37-AS1 CCDC39-AS1 CCL15-CCL14 CCND2-AS1 CCNT2-AS1 CD27-AS1 CD81-AS1 CDC37L1-AS1
 CDC42-IT1 CDH23-AS1 CDIPT-AS1 CDKN1A-AS1 CDKN2A-AS1 CDKN2B-AS1 CDR1-AS CEBPA-AS1
 CEBPB-AS1 CEBPZOS CECR5-AS1 CELF2-AS1 CELF2-AS2 CELSR3-AS1 CEP83-AS1 CERS3-AS1 CERS6-
 AS1 CCHE1 CFAP44-AS1 CFAP58-AS1 CFLAR-AS1 CHKB-AS1 CHKB-CPT1B CHL1-AS1 CHODL-AS1
 CISTR CHRM3-AS1 CHRM3-AS2 C1orf145 C1orf220 C11orf39 C11orf72 C14orf144 C18orf15 C3orf49 C5orf17
 C5orf56 C6orf7 C7orf13 C8orf49 CIRBP-AS1 CKMT2-AS1 CLDN10-AS1 CLIP1-AS1 CLSTN2-AS1 CLUHP3
 CLYBL-AS1 CLYBL-AS2 CDRT7 CDRT8 CNOT10-AS1 CNTFR-AS1 CNTN4-AS1 CNTN4-AS2 COL18A1-
 AS1 COL18A1-AS2 COL4A2-AS1 COL5A1-AS1 LOC387720 CAHM CCAT1 CCAT2 CRNDE COPG2IT1
 COX10-AS1 CPB2-AS1 CPEB1-AS1 CPEB2-AS1 CPS1-IT1 CRHR1-IT1 CRTC3-AS1 CRYM-AS1 CSE1L-AS1
 CSMD2-AS1 CSNK1G2-AS1 CSTF3-AS1 CTBP1-AS CTBP1-AS2 CYP17A1-AS1 CYP1B1-AS1 CYP4A22-AS1

[0836]

CYP51A1-AS1 D21S2088E DBET DAB1-AS1 DACT3-AS1 DAOA-AS1 DAPK1-IT1 DARS-AS1 DBH-AS1 DCTN1-AS1 DCUN1D2-AS DDC-AS1 DDX11-AS1 DDX26B-AS1 LOC642846 DLEU1 DLEU2 DENND5B-AS1 DEPDC1-AS1 DGUOK-AS1 DHRS4-AS1 DIAPH2-AS1 DIAPH3-AS1 DIAPH3-AS2 DICER1-AS1 DANCRCR10 DGCR11 DGCR7 DGCR7 DGCR9 DIO2-AS1 DIO3OS DIP2A-IT1 DISC1FP1 DISC1-IT1 DIRC3 DISC2 PKI55 DLEU1-AS1 DLEU7-AS1 DLG1-AS1 DLG3-AS1 DLG5-AS1 DLGAP1-AS1 DLGAP1-AS2 DLGAP1-AS3 DLGAP1-AS4 DLGAP1-AS5 DLGAP2-AS1 DLGAP4-AS1 DLX2-AS1 DLX6-AS1 DLX6-AS2 DMD-AS3 DNAH17-AS1 DNAJB5-AS1 DNAJB8-AS1 DNAJC27-AS1 DNAJC3-AS1 DNAJC9-AS1 DNM3-IT1 DNM3OS DNMBP-AS1 DALIR DOCK4-AS1 DOCK9-AS1 DOCK9-AS2 DSCR10 DSCR8 DSCR9 DRAIC DPH6-AS1 DPP10-AS1 DPP10-AS3 DPYD-AS1 DPYD-AS2 DPYD-IT1 DSCAS DSCAM-AS1 DSCAM-IT1 DSCR4-IT1 DSG1-AS1 DSG2-AS1 DNAH100S DYX1C1-CCPG1 ERICD E2F3-IT1 EAF1-AS1 EDNRB-AS1 EDRF1-AS1 EEF1E1-BLOC1S5 EFCAB14-AS1 EFCAB6-AS1 EFCAB10 EGFLAM-AS1 EGFLAM-AS2 EGFLAM-AS3 EGFLAM-AS4 EGFR-AS1 ELDR EHD4-AS1 EHHADH-AS1 EHMT1-IT1 EIF1AX-AS1 EIF1B-AS1 EIF2B5-AS1 EIF2B5-IT1 EIF3J-AS1 ELFN1-AS1 ELMO1-AS1 ELOVL2-AS1 ESRG EMC3-AS1 EML2-AS1 EMX2OS LOC105376387 ERVK13-1 ENO1-AS1 ENOX1-AS1 ENOX1-AS2 ENTPD1-AS1 ENTPD3-AS1 EGOT EP300-AS1 EPB41L4A-AS1 EPB41L4A-AS2 EPHA1-AS1 EPHA5-AS1 EPN2-AS1 EPN2-IT1 ERC2-IT1 ER13-IT1 ERICH1-AS1 ERICH3-AS1 ERICH6-AS1 ETV5-AS1 EVX1-AS EWSAT1 EXOC3-AS1 EXTL3-AS1 EZR-AS1 F10-AS1 F11-AS1 FAM13A-AS1 FAM155A-IT1 FAM167A-AS1 FAM170B-AS1 FAM181A-AS1 FAM212B-AS1 FAM222A-AS1 FAM24B-CUZD1 FAM53B-AS1 FAM83A-AS1 FAM83C-AS1 FAM83H-AS1 FAM106A FAM106B FAM106CP FAM138A FAM138B FAM138C FAM138D FAM138E FAM138F FAM157C FAM182A FAM182B FAM183CP FAM197Y4 FAM197Y5 FAM197Y7 FAM201A FAM215A FAM223A FAM223B FAM224A FAM224B FAM225A FAM225B FAM226A FAM226B FAM230B FAM230C FAM231D FAM27B FAM27C FAM27D1 FAM27E2 FAM27E3 FAM27L FAM41AY1 FAM41AY2 FAM41C FAM66A FAM66B FAM66C FAM66D FAM66E FAM74A1 FAM74A3 FAM74A4 FAM74A6 FAM74A7 FAM85A FAM87A FAM87B FAM95A FAM95B1 FAM95C FAM99A FAM99B FANK1-AS1 FARP1-AS1 FAS-AS1 FAR2P1 FAR2P2 FAR2P3 FBXL19-AS1 FBXO22-AS1 FBXO3-AS1 FBXO36-IT1 FER1L6-AS1 FER1L6-AS2 FEZF1-AS1 FGD5-AS1 FGF10-AS1 FGF12-AS1 FGF12-AS2 FGF12-AS3 FGF13-AS1 FGF14-AS1 FGF14-AS2 FGF14-IT1 FIRRE FKBP1A-SDCBP2 FKSG29 FLG-AS1 FLJ16171 FLJ26850 FLJ33360 FLJ35934 FLJ43879 FLJ45079 FLNB-AS1 FLVCR1-AS1 FMR1-AS1 FNDC1-IT1 FOCAD-AS1 FALEC FTCDNL1 FOXCUT FOXC2-AS1 FOXD2-AS1 FOXD3-AS1 FENDRR FOXG1-AS1 FOXN3-AS1 FOXN3-AS2 FOXP1-AS1 FOXP4-AS1 FREM2-AS1 FRMD6-AS1 FRMD6-AS2 FRMPD3-AS1 FRMPD4-AS1 FRY-AS1 FSIP2-AS1 FTCD-AS1 FTO-IT1 FTX FUT8-AS1 FZD10-AS1 GABPB1-AS1 GABRG3-AS1 GAS5-AS1 GAS6-AS1 GAS6-AS2 GAS8-AS1 GAPLINC GACAT1 GACAT2 GACAT3 GCRG224 GHET1 GATA2-AS1 GATA3-AS1 GATA6-AS1 GCSAML-AS1 GAEC1 GFOD1-AS1 GHRLOS GJA9-MYCBP GK-AS1 GLIDR GLIS2-AS1 GLIS3-AS1 GLYCTK-AS1 GMD5-AS1 GNA14-AS1 GNAS-AS1 GNG12-AS1 GPC5-AS1 GPC5-AS2 GPC5-IT1 GPC6-AS1 GPC6-AS2 GPR1-AS GPR158-AS1 GRID1-AS1 GRIK1-AS1 GRIK1-AS2 GRK5-IT1 GRM5-AS1 GRM7-AS1 GRM7-AS2 GRM7-AS3 GAS5 GDF5OS GRTP1-AS1 GSN-AS1 GTF3C2-AS1 GTSE1-AS1 GYG2-AS1 H19 H1FX-AS1 HAGLROS HAND2-AS1 HAO2-IT1 HAS2-AS1 HCF1-AS1 LOC100131635 LOC646268 LOC728040 LOC100130298 LOC729970 LOC727925 HDAC11-AS1 HECTD2-AS1 HPYR1 HELLPAR HCCAT5 HEIH HULC HEXA-AS1 HEXDC-IT1 HHATL-AS1 HHIP-AS1 HID1-AS1 HIF1A-AS1 HIF1A-AS2 HAR1A HAR1B HIPK1-AS1 HCG11 HCG14 HCG17 HCG18 HCG20 HCG21 HCG22 HCG23 HCG24 HCG25 HCG26 HCG27 HCG4 HCG4B HCG8 HCG9 HCP5 HLA-F-AS1 HLCS-IT1 HLTf-AS1 HLX-AS1 HM13-AS1 HMGN3-AS1 HMMR-AS1 HNF1A-AS1 HNF4A-AS1 HNRNPU-AS1 HNRNPUL2-BSCL2 HORMAD2-AS1 HOTAIR HOXA-AS2 HOXA-AS3 HOTTIP HOTAIRM1 HOXA10-AS HOXA10-HOXA9 HOXA11-AS HOXB-AS1 HOXB-AS2 HOXB-AS3 HOXB-AS4 HOXC-AS1 HOXC-AS2 HOXC-AS3 HOXC13-AS HAGLR HOXD-AS2 HPN-AS1 HS1BP3-IT1 HS6ST2-AS1 HSPB2-C11orf52 HTR2A-AS1 HTR5A-AS1 HTT-AS HPVC1 HYMAI HYI-AS1 IBA57-AS1 ID2-AS1 IDH1-AS1 IDI2-AS1 IFNG-AS1 IFT74-AS1 IGBP1-AS1 IRAIN IGF2-AS IGF2BP2-AS1 IGFBP7-AS1 IGSF11-AS1 IL10RB-AS1 IL12A-AS1 IL21-AS1 IL21R-AS1 ILF3-AS1 IPW INE1 INE2 INHBA-AS1 INMT-FAM188B INO80B-WBP1 INTS6-AS1 IPO11-LRRC70 IPO9-AS1 IQCF5-AS1 IQCH-AS1 IQCJ-SCHIP1-AS1 ISM1-AS1 ISPD-AS1 ISX-AS1 ITCH-IT1 ITFG1-AS1 ITGA9-AS1 ITGB2-AS1 ITGB5-AS1 ITIH4-AS1 ITPK1-AS1 ITPKB-AS1 ITPKB-IT1 ITPR1-AS1 JADRR JAKMIP2-AS1 JARID2-AS1 JAZF1-AS1 JHDM1D-AS1 JMJD1C-AS1 JPX JRKL-AS1 KANSL1-AS1 KBTBD11-OT1 KCNAB1-AS1 KCNAB1-AS2 KCNC4-AS1 KCND3-AS1 KCND3-IT1 KCNHI-IT1 KCNIP2-AS1 KCNIP4-IT1 KCNJ2-AS1 KCNJ6-AS1 KCNMA1-AS1 KCNMA1-AS2 KCNMA1-AS3 KCNMB2-AS1 KCNQ1-AS1 KCNQ1DN KCNQ1OT1 KCNQ5-AS1 KCNQ5-IT1 KCTD21-AS1 KDM4A-AS1 KANTR KDM5C-IT1 KC6 KIAA0087 KIAA0125 KIAA1656 KIAA1875 KIF25-AS1 KIF9-AS1 KIRREL3-AS1 KIRREL3-AS2 KIRREL3-AS3 KIZ-AS1 KLF3-AS1 KLF7-IT1 KLHL30-AS1 KLHL6-AS1 KLHL7-AS1 KMT2E-AS1 KRBOX1-AS1 KRT73-AS1 KRTAP5-AS1 KTN1-AS1 L3MBTL4-AS1 LACTB2-AS1

[0837]

LAMA5-AS1 LAMP5-AS1 LAMTOR5-AS1 LANCL1-AS1 LARGE-AS1 LARGE-IT1 LARS2-AS1 LATS2-AS1
 LBX1-AS1 LBX2-AS1 LCMT1-AS1 LCMT1-AS2 LDLRAD4-AS1 LEF1-AS1 LEMD1-AS1 LENG8-AS1
 LRRC37A5P LUNAR1 LGALS8-AS1 LHFPL3-AS1 LHFPL3-AS2 LHX4-AS1 LHX5-AS1 LIFR-AS1 LIMD1-
 AS1 LIMS3-LOC440895 LINGO1-AS1 LINGO1-AS2 LIPE-AS1 LLPH-AS1 LMCD1-AS1 LMF1-AS1 MLN-
 AS1 LMO7-AS1 LMO7DN-IT1 LNX1-AS1 LNX1-AS2 LOC100630923 LOC100499484-C9ORF174 LINC01000
 LINC01001 LINC01002 LINC01003 LINC01004 LINC01005 LINC01006 LINC01007 LINC01010 LINC01011
 LINC01012 LINC01013 LINC01014 LINC01015 LINC01016 LINC01017 LINC01018 LINC01019 LINC0102
 LINC01020 LINC01021 LINC01023 LINC01024 LINC01028 LINC01029 LINC01030 LINC01031 LINC01032
 LINC01033 LINC01036 LINC01038 LINC01039 LINC01040 LINC01043 LINC01044 LINC01046 LINC01047
 LINC01048 LINC01049 LINC01050 LINC01053 LINC01054 LINC01055 LINC01056 LINC01057 LINC01058
 LINC01059 LINC0106 LINC01060 LINC01061 LINC01063 LINC01065 LINC01068 LINC01069 LINC01070
 LINC01072 LINC01075 LINC01080 LINC01081 LINC01082 LINC01085 LINC01087 LINC01088 LINC01089
 LINC01090 LINC01091 LINC01093 LINC01094 LINC01095 LINC01096 LINC01097 LINC01098 LINC01099
 LINC01100 LINC01101 LINC01102 LINC01103 LINC01104 LINC01105 LINC01106 LINC01107 LINC01108
 LINC01109 LINC0111 LINC01111 LINC01114 LINC01115 LINC01116 LINC01117 LINC01118 LINC01119
 LINC0112 LINC01120 LINC01121 LINC01122 LINC01123 LINC01124 LINC01125 LINC01126 LINC01127
 LINC01128 LINC0113 LINC01132 LINC01133 LINC01134 LINC01135 LINC01136 LINC01137 LINC01138
 LINC01139 LINC0114 LINC01140 LINC01141 LINC01142 LINC01143 LINC01144 LINC01146 LINC01149
 LINC0115 LINC01150 LINC01151 LINC01152 LINC01153 LINC01158 LINC01159 LINC0116 LINC01160
 LINC01162 LINC01163 LINC01164 LINC01166 LINC01167 LINC01168 LINC01169 LINC01170 LINC01176
 LINC01177 LINC01179 LINC01180 LINC01182 LINC01184 LINC01185 LINC01186 LINC01187 LINC01189
 LINC01191 LINC01192 LINC01193 LINC01194 LINC01195 LINC01197 LINC01198 LINC01201 LINC01202
 LINC01203 LINC01204 LINC01205 LINC01206 LINC01207 LINC01208 LINC01209 LINC01210 LINC01212
 LINC01213 LINC01214 LINC01215 LINC01216 LINC01217 LINC01218 LINC01219 LINC01220 LINC01221
 LINC01222 LINC01224 LINC01226 LINC01227 LINC01228 LINC01229 LINC01230 LINC01231 LINC01232
 LINC01233 LINC01234 LINC01235 LINC01237 LINC01239 LINC01241 LINC01242 LINC01243 LINC01246
 LINC01247 LINC01248 LINC01249 LINC01250 LINC01251 LINC01252 LINC01254 LINC01255 LINC01256
 LINC01257 LINC01258 LINC01260 LINC01262 LINC01264 LINC01265 LINC01266 LINC01267 LINC01268
 LINC01269 LINC01270 LINC01271 LINC01273 LINC01276 LINC01277 LINC01278 LINC01279 LINC01280
 LINC01281 LINC01282 LINC01284 LINC01285 LINC01287 LINC01288 LINC01289 LINC01291 LINC01293
 LINC01296 LINC01298 LINC01299 LINC01300 LINC01301 LINC01304 LINC01305 LINC01307 LINC01309
 LINC01310 LINC01311 LINC01312 LINC01314 LINC01315 LINC01317 LINC01320 LINC01322 LINC01324
 LINC01327 LINC01331 LINC01333 LINC01335 LINC01336 LINC01337 LINC01338 LINC01339 LINC01340
 LINC01341 LINC01342 LINC01343 LINC01344 LINC01346 LINC01347 LINC01348 LINC01349 LINC01350
 LINC01351 LINC01352 LINC01353 LINC01354 LINC01355 LINC01356 LINC01358 LINC01359 LINC01360
 LINC01361 LINC01362 LINC01363 LINC01364 LINC01365 LINC01366 LINC01370 LINC01372 LINC01375
 LINC01377 LINC01378 LINC01384 LINC01386 LINC01387 LINC01389 LINC01391 LINC01392 LINC01393
 LINC01395 LINC01396 LINC01397 LINC01398 LINC01399 LINC01402 LINC01405 LINC01410 LINC01411
 LINC01412 LINC01413 LINC01416 LINC01419 LINC01420 LINC01422 LINC01423 LINC01424 LINC01425
 LINC01426 LINC01427 LINC01428 LINC01429 LINC01430 LINC01431 LINC01432 LINC01433 LINC01435
 LINC01436 LINC01440 LINC01441 LINC01442 LINC01443 LINC01444 LINC01445 LINC01446 LINC01447
 LINC01448 LINC01449 LINC01450 LINC01452 LINC01455 LINC01461 LINC01465 LINC01467 LINC01468
 LINC01470 LINC01471 LINC01473 LINC01474 LINC01475 LINC01476 LINC01477 LINC01478 LINC01479
 LINC01480 LINC01481 LINC01482 LINC01483 LINC01484 LINC01485 LINC01486 LINC01487 LINC01488
 LINC01489 LINC01490 LINC01491 LINC01492 LINC01493 LINC01494 LINC01495 LINC01496 LINC01497
 LINC01498 LINC01499 LINC01500 LINC01501 LINC01502 LINC01503 LINC01504 LINC01505 LINC01506
 LINC01507 LINC01508 LINC01509 LINC01510 LINC01511 LINC01512 LINC01514 LINC01515 LINC01516
 LINC01517 LINC01518 LINC01519 LINC0152 LINC01520 LINC01521 LINC01522 LINC01523 LINC01524
 LINC01525 LINC01526 LINC01527 LINC01529 LINC01530 LINC01531 LINC01532 LINC01533 LINC01534
 LINC01535 LINC01537 LINC01538 LINC01539 LINC01541 LINC01543 LINC01544 LINC01545 LINC01546
 LINC01547 LINC01548 LINC01549 LINC01550 LINC01551 LINC01552 LINC01553 LINC01554 LINC01555
 LINC01556 LINC01558 LINC01559 LINC01560 LINC01561 LINC01562 LINC01563 LINC01564 LINC01565
 LINC01566 LINC01567 LINC01568 LINC01569 LINC01570 LINC01571 LINC01572 LINC01573 LINC01574
 LINC01578 LINC01579 LINC0158 LINC01580 LINC01581 LINC01582 LINC01583 LINC01584 LINC01585
 LINC01586 LINC01587 LINC01588 LINC01589 LINC0159 LINC01590 LINC01591 LINC01592 LINC01594
 LINC01599 LINC0160 LINC01600 LINC01601 LINC01602 LINC01603 LINC01604 LINC01605 LINC01606

[0838]

LINC01607 LINC01608 LINC01609 LINC00161 LINC00162 LINC00163 LINC00165 LINC00167 LINC00173
 LINC00174 LINC00176 LINC00184 LINC00189 LINC00200 LINC00202-1 LINC00202-2 LINC00205
 LINC00207 LINC00208 LINC00210 LINC00211 LINC00216 LINC00221 LINC00222 LINC00226 LINC00229
 LINC00235 LINC00237 LINC00238 LINC00239 LINC00240 LINC00242 LINC00243 LINC00244 LINC00251
 LINC00254 LINC00260 LINC00261 LINC00264 LINC00265 LINC00266-1 LINC00266-3 LINC00268
 LINC00269 LINC00271 LINC00272 LINC00273 LINC00276 LINC00278 LINC00279 LINC00028 LINC00280
 LINC00282 LINC00283 LINC00284 LINC00029 LINC00290 LINC00293 LINC00294 LINC00297 LINC00298
 LINC00299 LINC00301 LINC00303 LINC00304 LINC00305 LINC00307 LINC00308 LINC00309 LINC00310
 LINC00311 LINC00312 LINC00313 LINC00314 LINC00315 LINC00316 LINC00317 LINC00319 LINC00032
 LINC00320 LINC00322 LINC00323 LINC00324 LINC00326 LINC00327 LINC00330 LINC00331 LINC00332
 LINC00333 LINC00336 LINC00337 LINC00339 LINC00341 LINC00342 LINC00343 LINC00345 LINC00346
 LINC00347 LINC00348 LINC00349 LINC00350 LINC00351 LINC00352 LINC00353 LINC00354 LINC00358
 LINC00359 LINC00362 LINC00363 LINC00364 LINC00365 LINC00366 LINC00367 LINC00368 LINC00370
 LINC00371 LINC00375 LINC00376 LINC00377 LINC00378 LINC00379 LINC00380 LINC00381 LINC00382
 LINC00383 LINC00384 LINC00387 LINC00388 LINC00391 LINC00392 LINC00393 LINC00395 LINC00396
 LINC00397 LINC00398 LINC00399 LINC00400 LINC00402 LINC00403 LINC00404 LINC00408 LINC00410
 LINC00411 LINC00412 LINC00415 LINC00417 LINC00421 LINC00423 LINC00424 LINC00426 LINC00427
 LINC00428 LINC00431 LINC00433 LINC00434 LINC00437 LINC00440 LINC00441 LINC00442 LINC00443
 LINC00444 LINC00445 LINC00446 LINC00448 LINC00454 LINC00456 LINC00457 LINC00458 LINC00459
 LINC00460 LINC00461 LINC00462 LINC00463 LINC00466 LINC00467 LINC00469 LINC00470 LINC00471
 LINC00472 LINC00473 LINC00474 LINC00475 LINC00476 LINC00477 LINC00479 LINC00482 LINC00483
 LINC00485 LINC00486 LINC00487 LINC00488 LINC00489 LINC00491 LINC00492 LINC00493 LINC00494
 LINC00498 LINC00499 LINC00501 LINC00502 LINC00504 LINC00505 LINC00506 LINC00507 LINC00508
 LINC00051 LINC00511 LINC00514 LINC00515 LINC00518 LINC00052 LINC00520 LINC00521 LINC00523
 LINC00524 LINC00525 LINC00526 LINC00527 LINC00528 LINC00529 LINC00534 LINC00535 LINC00536
 LINC00537 LINC00538 LINC00539 LINC00540 LINC00544 LINC00545 LINC00547 LINC00548 LINC00550
 LINC00551 LINC00552 LINC00554 LINC00555 LINC00556 LINC00557 LINC00558 LINC00559 LINC00560
 LINC00561 LINC00562 LINC00563 LINC00564 LINC00565 LINC00566 LINC00570 LINC00571 LINC00572
 LINC00574 LINC00575 LINC00577 LINC00578 LINC00581 LINC00582 LINC00583 LINC00587 LINC00588
 LINC00589 LINC00592 LINC00593 LINC00595 LINC00596 LINC00597 LINC00598 LINC00599 LINC00601
 LINC00602 LINC00603 LINC00605 LINC00606 LINC00607 LINC00608 LINC00609 LINC00610 LINC00612
 LINC00613 LINC00614 LINC00615 LINC00616 LINC00618 LINC00619 LINC00620 LINC00621 LINC00622
 LINC00623 LINC00624 LINC00626 LINC00628 LINC00629 LINC00630 LINC00632 LINC00633 LINC00634
 LINC00635 LINC00636 LINC00637 LINC00638 LINC00639 LINC00640 LINC00641 LINC00642 LINC00643
 LINC00644 LINC00645 LINC00648 LINC00649 LINC00652 LINC00654 LINC00656 LINC00657 LINC00658
 LINC00659 LINC00661 LINC00662 LINC00663 LINC00664 LINC00665 LINC00667 LINC00668 LINC00669
 LINC00670 LINC00671 LINC00672 LINC00673 LINC00674 LINC00675 LINC00676 LINC00677 LINC00678
 LINC00681 LINC00682 LINC00683 LINC00684 LOC100132304 LINC00685 LINC00686 LINC00687
 LINC00689 LINC00690 LINC00691 LINC00692 LINC00693 LINC00694 LINC00696 LINC00698 LINC00700
 LINC00701 LINC00702 LINC00703 LINC00704 LINC00705 LINC00706 LINC00707 LINC00708 LINC00709
 LINC00710 LINC00824 LINC00836 LINC00837 LINC00838 LINC00839 LINC00840 LINC00841 LINC00842
 LINC00843 LINC00844 LINC00845 LINC00847 LINC00849 LINC00850 LINC00851 LINC00852 LINC00853
 LINC00854 LINC00856 LINC00857 LINC00858 LINC00861 LINC00862 LINC00864 LINC00865 LINC00866
 LINC00867 LINC00869 LINC00870 LINC00871 LINC00877 LINC00879 LINC00880 LINC00881 LINC00882
 LINC00883 LINC00884 LINC00885 LINC00886 LINC00887 LINC00888 LINC00889 LINC00890 LINC00891
 LINC00892 LINC00893 LINC00894 LINC00895 LINC00896 LINC00898 LINC00899 LINC00900 LINC00901
 LINC00903 LINC00904 LINC00905 LINC00906 LINC00907 LINC00908 LINC00909 LINC00910 LINC00911
 LINC00914 LINC00917 LINC00919 LINC00092 LINC00920 LINC00921 LINC00922 LINC00923 LINC00924
 LINC00925 LINC00926 LINC00927 LINC00928 LINC00929 LINC00930 LINC00933 LINC00934 LINC00935
 LINC00936 LINC00937 LINC00938 LINC00939 LINC00094 LINC00940 LINC00941 LINC00942 LINC00943
 LINC00944 LINC00945 LINC00950 LINC00951 LINC00954 LINC00955 LINC00957 LINC00958 LINC00959
 LINC00960 LINC00961 LINC00963 LINC00964 LINC00965 LINC00967 LINC00968 LINC00969 LINC00970
 LINC00971 LINC00972 LINC00973 LINC00974 LINC00977 LINC00982 LINC00987 LINC00989 LINC00992
 LINC00993 LINC00994 LINC00996 LINC00997 LINC00998 LINC00999 PNKY LINCMD1 LINC-PINT LINC-
 ROR LOH12CR2 LOXL1-AS1 LPP-AS1 LPP-AS2 LRP4-AS1 LRRC2-AS1 LRRC3-AS1 LRRC3DN LRRC75A-
 AS1 LSAMP-AS1 LACAT1 LUCAT1 LCA10 LURAP1L-AS1 LY86-AS1 LYPLAL1-AS1 LYST-AS1 LZTS1-

[0839]

AS1 MACC1-AS1 MACROD2-AS1 MACROD2-IT1 MAFTRR MAFA-AS1 MAFG-AS1 MAGEA8-AS1
 MAG11-AS1 MAGI2-AS1 MAGI2-AS2 MAGI2-AS3 MAMDC2-AS1 MAN1B1-AS1 MANEA-AS1 MAP3K14-
 AS1 MAPKAPK5-AS1 MAPT-AS1 MAPT-IT1 MAST4-AS1 MAST4-IT1 MEG3 MEG8 MEG9 MATN1-AS1
 MBNL1-AS1 MCF2L-AS1 MCHR2-AS1 MCM3AP-AS1 MCM8-AS1 MCPH1-AS1 MED4-AS1 MEF2C-AS1
 MEIS1-AS2 MEIS1-AS3 MEAT6 MEOX2-AS1 MIMT1 MESTIT1 MALAT1 MF12-AS1 MGAT3-AS1 MIA-
 RAB4B MIATNB MIR100 MIR101-1 MIR101-2 MIR103A1 MIR103A2 MIR103B1 MIR103B2 MIR105-1
 MIR105-2 MIR106A MIR106B MIR107 MIR10A MIR10B MIR1-1 MIR1178 MIR1179 MIR1180 MIR1181
 MIR1182 MIR1183 MIR1184-1 MIR1184-2 MIR1184-3 MIR1185-1 MIR1185-2 MIR1193 MIR1197 MIR1199
 MIR1-2 MIR1200 MIR1202 MIR1203 MIR1204 MIR1205 MIR1206 MIR1207 MIR1208 MIR122 MIR1224
 MIR1225 MIR1226 MIR1227 MIR1228 MIR1229 MIR1231 MIR1233-1 MIR1233-2 MIR1234 MIR1236
 MIR1237 MIR1238 MIR124-1 MIR124-2 MIR1243 MIR124-3 MIR1244-1 MIR1244-2 MIR1244-3 MIR1244-4
 MIR1245A MIR1245B MIR1246 MIR1247 MIR1248 MIR1249 MIR1250 MIR1251 MIR1252 MIR1253
 MIR1254-1 MIR1254-2 MIR1255A MIR1255B1 MIR1255B2 MIR1256 MIR1257 MIR1258 MIR125A MIR125B1
 MIR125B2 MIR126 MIR1260A MIR1260B MIR1261 MIR1262 MIR1263 MIR1264 MIR1265 MIR1266
 MIR1267 MIR1268A MIR1268B MIR1269A MIR1269B MIR127 MIR1270 MIR1271 MIR1272 MIR1273A
 MIR1273C MIR1273D MIR1273E MIR1273F MIR1273G MIR1273H MIR1275 MIR1276 MIR1277 MIR1278
 MIR1279 MIR1281 MIR128-1 MIR1282 MIR128-2 MIR1283-1 MIR1283-2 MIR1284 MIR1285-1 MIR1285-2
 MIR1286 MIR1287 MIR1288 MIR1289-1 MIR1289-2 MIR1290 MIR1291 MIR129-1 MIR1292 MIR129-2
 MIR1293 MIR1294 MIR1295A MIR1295B MIR1296 MIR1297 MIR1298 MIR1299 MIR1301 MIR1302-1
 MIR1302-10 MIR1302-11 MIR1302-2 MIR1302-3 MIR1302-4 MIR1302-5 MIR1302-6 MIR1302-7 MIR1302-8
 MIR1302-9 MIR1303 MIR1304 MIR1305 MIR1306 MIR1307 MIR130A MIR130B MIR132 MIR1321 MIR1322
 MIR1323 MIR1324 MIR133A1 MIR133A2 MIR133B MIR134 MIR1343 MIR135A1 MIR135A2 MIR135B
 MIR136 MIR137 MIR138-1 MIR138-2 MIR139 MIR140 MIR141 MIR142 MIR143 MIR144 MIR145 MIR1468
 MIR1469 MIR146A MIR146B MIR1470 MIR1471 MIR147A MIR147B MIR148A MIR148B MIR149 MIR150
 MIR151A MIR151B MIR152 MIR153-1 MIR153-2 MIR1537 MIR1538 MIR1539 MIR154 MIR155 MIR1587
 MIR15A MIR15B MIR16-1 MIR16-2 MIR17 MIR181A1 MIR181A2 MIR181B1 MIR181B2 MIR181C MIR181D
 MIR182 MIR1825 MIR1827 MIR183 MIR184 MIR185 MIR186 MIR187 MIR188 MIR18A MIR18B MIR1908
 MIR1909 MIR190A MIR190B MIR191 MIR1910 MIR1911 MIR1912 MIR1913 MIR1914 MIR1915 MIR192
 MIR193A MIR193B MIR194-1 MIR194-2 MIR195 MIR196A1 MIR196A2 MIR196B MIR197 MIR1972-1
 MIR1972-2 MIR1973 MIR1976 MIR198 MIR199A1 MIR199A2 MIR199B MIR19A MIR19B1 MIR19B2
 MIR200A MIR200B MIR200C MIR202 MIR203A MIR203B MIR204 MIR205 MIR2052 MIR2053 MIR2054
 MIR206 MIR208A MIR208B MIR20A MIR20B MIR21 MIR210 MIR211 MIR2110 MIR2113 MIR2114 MIR2115
 MIR2116 MIR2117 MIR212 MIR214 MIR215 MIR216A MIR216B MIR217 MIR218-1 MIR218-2 MIR219A1
 MIR219A2 MIR219B MIR221 MIR221 MIR222 MIR223 MIR224 MIR2276 MIR2277 MIR2278 MIR2355
 MIR2392 MIR23A MIR23B MIR23C MIR24-1 MIR24-2 MIR2467 MIR25 MIR2681 MIR2682 MIR26A1
 MIR26A2 MIR26B MIR27A MIR27B MIR28 MIR2861 MIR2909 MIR296 MIR297 MIR298 MIR299 MIR29A
 MIR29B1 MIR29B2 MIR29C MIR300 MIR301A MIR301B MIR302A MIR302B MIR302C MIR302D MIR302E
 MIR302F MIR3064 MIR3065 MIR3074 MIR30A MIR30B MIR30C1 MIR30C2 MIR30D MIR30E MIR31
 MIR3115 MIR3116-1 MIR3116-2 MIR3117 MIR3118-1 MIR3118-2 MIR3118-3 MIR3118-4 MIR3119-1
 MIR3119-2 MIR3120 MIR3121 MIR3122 MIR3123 MIR3124 MIR3125 MIR3126 MIR3127 MIR3128 MIR3129
 MIR3130-1 MIR3130-2 MIR3131 MIR3132 MIR3133 MIR3134 MIR3135A MIR3135B MIR3136 MIR3137
 MIR3138 MIR3139 MIR3140 MIR3141 MIR3142 MIR3143 MIR3144 MIR3145 MIR3146 MIR3147 MIR3148
 MIR3149 MIR3150A MIR3150B MIR3151 MIR3152 MIR3153 MIR3154 MIR3155A MIR3155B MIR3156-1
 MIR3156-2 MIR3156-3 MIR3157 MIR3158-1 MIR3158-2 MIR3159 MIR3160-1 MIR3160-2 MIR3161 MIR3162
 MIR3163 MIR3164 MIR3165 MIR3166 MIR3167 MIR3168 MIR3169 MIR3170 MIR3171 MIR3173 MIR3174
 MIR3175 MIR3176 MIR3177 MIR3178 MIR3179-1 MIR3179-2 MIR3179-3 MIR3179-4 MIR3180-1 MIR3180-2
 MIR3180-3 MIR3180-4 MIR3180-5 MIR3181 MIR3182 MIR3183 MIR3184 MIR3185 MIR3186 MIR3187
 MIR3188 MIR3189 MIR3190 MIR3191 MIR3192 MIR3193 MIR3194 MIR3195 MIR3196 MIR3197 MIR3198-1
 MIR3198-2 MIR3199-1 MIR3199-2 MIR32 MIR3200 MIR3201 MIR3202-1 MIR3202-2 MIR320A MIR320B1
 MIR320B2 MIR320C1 MIR320C2 MIR320D1 MIR320D2 MIR320E MIR323A MIR323B MIR324 MIR325
 MIR326 MIR328 MIR329-1 MIR329-2 MIR330 MIR331 MIR335 MIR337 MIR338 MIR339 MIR33A MIR33B
 MIR340 MIR342 MIR345 MIR346 MIR34A MIR34B MIR34C MIR3529 MIR3591 MIR3605 MIR3606 MIR3607
 MIR3609 MIR361 MIR3610 MIR3611 MIR3612 MIR3613 MIR3614 MIR3615 MIR3616 MIR3617 MIR3618
 MIR3619 MIR362 MIR3620 MIR3621 MIR3622A MIR3622B MIR363 MIR3646 MIR3648-1 MIR3648-2
 MIR3649 MIR3650 MIR3651 MIR3652 MIR3653 MIR3654 MIR3655 MIR3656 MIR3657 MIR3658 MIR3659
 MIR365A MIR365B MIR3660 MIR3661 MIR3662 MIR3663 MIR3664 MIR3665 MIR3666 MIR3667 MIR3668

[0840]

MIR367 MIR3670-1 MIR3670-2 MIR3670-3 MIR3670-4 MIR3671 MIR3672 MIR3674 MIR3675 MIR3677
MIR3678 MIR3679 MIR3680-1 MIR3680-2 MIR3681 MIR3682 MIR3683 MIR3684 MIR3685 MIR3686
MIR3687-1 MIR3687-2 MIR3688-1 MIR3688-2 MIR3689A MIR3689B MIR3689C MIR3689D1 MIR3689D2
MIR3689E MIR3689F MIR369 MIR3690 MIR3691 MIR3692 MIR370 MIR3713 MIR3714 MIR371A MIR371B
MIR372 MIR373 MIR374A MIR374B MIR374C MIR375 MIR376A1 MIR376A2 MIR376B MIR376C MIR377
MIR378A MIR378B MIR378C MIR378D1 MIR378D2 MIR378E MIR378F MIR378G MIR378H MIR378I
MIR378J MIR379 MIR380 MIR381 MIR382 MIR383 MIR384 MIR3907 MIR3908 MIR3909 MIR3910-1
MIR3910-2 MIR3911 MIR3912 MIR3913-1 MIR3913-2 MIR3914-1 MIR3914-2 MIR3915 MIR3916 MIR3917
MIR3918 MIR3919 MIR3920 MIR3921 MIR3922 MIR3923 MIR3924 MIR3925 MIR3926-1 MIR3926-2
MIR3927 MIR3928 MIR3929 MIR3934 MIR3935 MIR3936 MIR3937 MIR3938 MIR3939 MIR3940 MIR3941
MIR3942 MIR3943 MIR3944 MIR3945 MIR3960 MIR3972 MIR3973 MIR3974 MIR3975 MIR3976 MIR3977
MIR3978 MIR409 MIR410 MIR411 MIR412 MIR421 MIR422A MIR423 MIR424 MIR425 MIR4251 MIR4252
MIR4253 MIR4254 MIR4255 MIR4256 MIR4257 MIR4258 MIR4259 MIR4260 MIR4261 MIR4262 MIR4263
MIR4264 MIR4265 MIR4266 MIR4267 MIR4268 MIR4269 MIR4270 MIR4271 MIR4272 MIR4273 MIR4274
MIR4275 MIR4276 MIR4277 MIR4278 MIR4279 MIR4280 MIR4281 MIR4282 MIR4283-1 MIR4283-2
MIR4284 MIR4285 MIR4286 MIR4287 MIR4288 MIR4289 MIR429 MIR4290 MIR4291 MIR4292 MIR4293
MIR4294 MIR4295 MIR4296 MIR4297 MIR4298 MIR4299 MIR4300 MIR4301 MIR4302 MIR4303 MIR4304
MIR4305 MIR4306 MIR4307 MIR4308 MIR4309 MIR431 MIR4310 MIR4311 MIR4312 MIR4313 MIR4314
MIR4315-1 MIR4315-2 MIR4316 MIR4317 MIR4318 MIR4319 MIR432 MIR4320 MIR4321 MIR4322 MIR4323
MIR4324 MIR4325 MIR4326 MIR4327 MIR4328 MIR4329 MIR433 MIR4330 MIR4417 MIR4418 MIR4419A
MIR4419B MIR4420 MIR4421 MIR4422 MIR4423 MIR4424 MIR4425 MIR4426 MIR4427 MIR4428 MIR4429
MIR4430 MIR4431 MIR4432 MIR4433A MIR4433B MIR4434 MIR4435-1 MIR4435-2 MIR4436A MIR4436B1
MIR4436B2 MIR4437 MIR4438 MIR4439 MIR4440 MIR4441 MIR4442 MIR4443 MIR4444-1 MIR4444-2
MIR4445 MIR4446 MIR4447 MIR4448 MIR4449 MIR4450 MIR4451 MIR4452 MIR4453 MIR4454 MIR4455
MIR4456 MIR4457 MIR4458 MIR4459 MIR4460 MIR4461 MIR4462 MIR4463 MIR4464 MIR4465 MIR4466
MIR4467 MIR4468 MIR4469 MIR4470 MIR4471 MIR4472-1 MIR4472-2 MIR4473 MIR4474 MIR4475
MIR4476 MIR4477A MIR4477B MIR4478 MIR4479 MIR448 MIR4480 MIR4481 MIR4482 MIR4483 MIR4484
MIR4485 MIR4486 MIR4487 MIR4488 MIR4489 MIR4490 MIR4491 MIR4492 MIR4493 MIR4494 MIR4495
MIR4496 MIR4497 MIR4498 MIR4499 MIR449A MIR449B MIR449C MIR4500 MIR4501 MIR4502 MIR4503
MIR4504 MIR4505 MIR4506 MIR4507 MIR4508 MIR4509-1 MIR4509-2 MIR4509-3 MIR450A1 MIR450A2
MIR450B MIR4510 MIR4511 MIR4512 MIR4513 MIR4514 MIR4515 MIR4516 MIR4517 MIR4518 MIR4519
MIR451A MIR451B MIR452 MIR4520-1 MIR4520-2 MIR4521 MIR4522 MIR4523 MIR4524A MIR4524B
MIR4525 MIR4526 MIR4527 MIR4528 MIR4529 MIR4530 MIR4531 MIR4532 MIR4533 MIR4534 MIR4535
MIR4536-1 MIR4536-2 MIR4537 MIR4538 MIR4539 MIR454 MIR4540 MIR455 MIR4632 MIR4633 MIR4634
MIR4635 MIR4636 MIR4637 MIR4638 MIR4639 MIR4640 MIR4641 MIR4642 MIR4643 MIR4644 MIR4645
MIR4646 MIR4647 MIR4648 MIR4649 MIR4650-1 MIR4650-2 MIR4651 MIR4652 MIR4653 MIR4654
MIR4655 MIR4656 MIR4657 MIR4658 MIR4659A MIR4659B MIR466 MIR4660 MIR4661 MIR4662A
MIR4662B MIR4663 MIR4664 MIR4665 MIR4666A MIR4666B MIR4667 MIR4668 MIR4669 MIR4670
MIR4671 MIR4672 MIR4673 MIR4674 MIR4675 MIR4676 MIR4677 MIR4678 MIR4679-1 MIR4679-2
MIR4680 MIR4681 MIR4682 MIR4683 MIR4684 MIR4685 MIR4686 MIR4687 MIR4688 MIR4689 MIR4690
MIR4691 MIR4692 MIR4693 MIR4694 MIR4695 MIR4696 MIR4697 MIR4698 MIR4699 MIR4700 MIR4701
MIR4703 MIR4704 MIR4705 MIR4706 MIR4707 MIR4708 MIR4709 MIR4710 MIR4711 MIR4712 MIR4713
MIR4714 MIR4715 MIR4716 MIR4717 MIR4718 MIR4719 MIR4720 MIR4721 MIR4722 MIR4723 MIR4724
MIR4725 MIR4726 MIR4727 MIR4728 MIR4729 MIR4730 MIR4731 MIR4732 MIR4733 MIR4734 MIR4735
MIR4736 MIR4737 MIR4738 MIR4739 MIR4740 MIR4741 MIR4742 MIR4743 MIR4744 MIR4745 MIR4746
MIR4747 MIR4748 MIR4749 MIR4750 MIR4751 MIR4752 MIR4753 MIR4754 MIR4755 MIR4756 MIR4757
MIR4758 MIR4759 MIR4760 MIR4761 MIR4762 MIR4763 MIR4764 MIR4765 MIR4766 MIR4767 MIR4768
MIR4769 MIR4770 MIR4771-1 MIR4771-2 MIR4772 MIR4773-1 MIR4773-2 MIR4774 MIR4775 MIR4776-1
MIR4776-2 MIR4777 MIR4778 MIR4779 MIR4780 MIR4781 MIR4782 MIR4783 MIR4784 MIR4785 MIR4786
MIR4787 MIR4788 MIR4789 MIR4790 MIR4791 MIR4792 MIR4793 MIR4794 MIR4795 MIR4796 MIR4797
MIR4798 MIR4799 MIR4800 MIR4801 MIR4802 MIR4803 MIR4804 MIR483 MIR484 MIR485 MIR486-1
MIR486-2 MIR487A MIR487B MIR488 MIR489 MIR490 MIR491 MIR492 MIR493 MIR494 MIR495 MIR496
MIR497 MIR498 MIR499 MIR499A MIR499B MIR5000 MIR5001 MIR5002 MIR5003 MIR5004 MIR5006
MIR5007 MIR5008 MIR5009 MIR500A MIR500B MIR501 MIR5010 MIR5011 MIR502 MIR503 MIR504
MIR5047 MIR505 MIR506 MIR507 MIR508 MIR5087 MIR5088 MIR5089 MIR5090 MIR5091 MIR509-1
MIR5092 MIR509-2 MIR5093 MIR509-3 MIR5094 MIR5095 MIR5096 MIR510 MIR5100 MIR511 MIR512-1

[0841]

MIR512-2 MIR513A1 MIR513A2 MIR513B MIR513C MIR514A1 MIR514A2 MIR514A3 MIR514B MIR515-1
MIR515-2 MIR516A1 MIR516A2 MIR516B1 MIR516B2 MIR517A MIR517B MIR517C MIR518E MIR5187
MIR5188 MIR5189 MIR518A1 MIR518A2 MIR518B MIR518C MIR518D MIR518E MIR518F MIR5190
MIR5191 MIR5192 MIR5193 MIR5194 MIR5195 MIR5196 MIR5197 MIR519A1 MIR519A2 MIR519B
MIR519C MIR519D MIR519E MIR520A MIR520B MIR520C MIR520D MIR520E MIR520F MIR520G
MIR520H MIR521-1 MIR521-2 MIR522 MIR523 MIR524 MIR525 MIR526A1 MIR526A2 MIR526B MIR527
MIR532 MIR539 MIR541 MIR542 MIR543 MIR544A MIR544B MIR545 MIR548A1 MIR548A2 MIR548A3
MIR548AA1 MIR548AA2 MIR548AB MIR548AC MIR548AD MIR548AE1 MIR548AE2 MIR548AG1
MIR548AG2 MIR548AH MIR548AI MIR548AJ1 MIR548AJ2 MIR548AK MIR548AL MIR548AM MIR548AN
MIR548AO MIR548AP MIR548AQ MIR548AR MIR548AS MIR548AT MIR548AU MIR548AV MIR548AW
MIR548AX MIR548AY MIR548AZ MIR548B MIR548BA MIR548BB MIR548C MIR548D1 MIR548D2
MIR548E MIR548F1 MIR548F2 MIR548F3 MIR548F4 MIR548F5 MIR548G MIR548H1 MIR548H2 MIR548H3
MIR548H4 MIR548H5 MIR548I1 MIR548I2 MIR548I3 MIR548I4 MIR548J MIR548K MIR548L MIR548M
MIR548N MIR548O MIR548O2 MIR548P MIR548Q MIR548S MIR548T MIR548U MIR548V MIR548W
MIR548X MIR548X2 MIR548Y MIR548Z MIR549A MIR550A1 MIR550A2 MIR550A3 MIR550B1 MIR550B2
MIR551A MIR551B MIR552 MIR553 MIR554 MIR555 MIR556 MIR557 MIR5571 MIR5572 MIR5579 MIR558
MIR5580 MIR5581 MIR5582 MIR5583-1 MIR5583-2 MIR5584 MIR5585 MIR5586 MIR5587 MIR5588
MIR5589 MIR559 MIR5590 MIR5591 MIR561 MIR562 MIR563 MIR564 MIR566 MIR567 MIR568 MIR5680
MIR5681A MIR5681B MIR5682 MIR5683 MIR5684 MIR5685 MIR5687 MIR5688 MIR5689 MIR569 MIR5690
MIR5691 MIR5692A1 MIR5692A2 MIR5692B MIR5692C1 MIR5692C2 MIR5693 MIR5694 MIR5695 MIR5696
MIR5697 MIR5698 MIR5699 MIR570 MIR5700 MIR5701-1 MIR5701-2 MIR5701-3 MIR5702 MIR5703
MIR5704 MIR5705 MIR5706 MIR5707 MIR5708 MIR571 MIR572 MIR573 MIR5739 MIR574 MIR575 MIR576
MIR577 MIR578 MIR5787 MIR579 MIR580 MIR581 MIR582 MIR583 MIR584 MIR585 MIR586 MIR587
MIR588 MIR589 MIR590 MIR591 MIR592 MIR593 MIR595 MIR596 MIR597 MIR598 MIR599 MIR600
MIR601 MIR602 MIR603 MIR604 MIR605 MIR606 MIR6068 MIR6069 MIR607 MIR6070 MIR6071 MIR6072
MIR6073 MIR6074 MIR6075 MIR6076 MIR6077 MIR6078 MIR6079 MIR608 MIR6080 MIR6081 MIR6082
MIR6083 MIR6084 MIR6085 MIR6086 MIR6087 MIR6088 MIR6089 MIR609 MIR6090 MIR610 MIR611
MIR612 MIR6124 MIR6125 MIR6126 MIR6127 MIR6128 MIR6129 MIR613 MIR6130 MIR6131 MIR6132
MIR6133 MIR6134 MIR614 MIR615 MIR616 MIR6165 MIR617 MIR618 MIR619 MIR620 MIR621 MIR622
MIR623 MIR624 MIR625 MIR626 MIR627 MIR628 MIR629 MIR630 MIR631 MIR632 MIR633 MIR634
MIR635 MIR636 MIR637 MIR638 MIR639 MIR640 MIR641 MIR642A MIR642B MIR643 MIR644A MIR645
MIR646 MIR647 MIR648 MIR649 MIR6499 MIR650 MIR6500 MIR6501 MIR6502 MIR6503 MIR6504
MIR6505 MIR6506 MIR6507 MIR6508 MIR6509 MIR651 MIR6510 MIR6511A1 MIR6511A2 MIR6511A3
MIR6511A4 MIR6511B1 MIR6511B2 MIR6512 MIR6513 MIR6514 MIR6515 MIR6516 MIR652 MIR653
MIR654 MIR655 MIR656 MIR657 MIR658 MIR659 MIR660 MIR661 MIR662 MIR663A MIR663B MIR664A
MIR664B MIR665 MIR668 MIR670 MIR671 MIR6715A MIR6715B MIR6716 MIR6717 MIR6718 MIR6719
MIR6720 MIR6721 MIR6722 MIR6723 MIR6724-1 MIR6724-2 MIR6724-3 MIR6724-4 MIR6726 MIR6727
MIR6728 MIR6729 MIR6730 MIR6731 MIR6732 MIR6733 MIR6734 MIR6735 MIR6736 MIR6737 MIR6738
MIR6739 MIR6740 MIR6741 MIR6742 MIR6743 MIR6744 MIR6745 MIR6746 MIR6747 MIR6748 MIR6749
MIR675 MIR6750 MIR6751 MIR6752 MIR6753 MIR6754 MIR6755 MIR6756 MIR6757 MIR6758 MIR6759
MIR676 MIR6760 MIR6761 MIR6762 MIR6763 MIR6764 MIR6765 MIR6766 MIR6767 MIR6768 MIR6769A
MIR6769B MIR6770-1 MIR6770-2 MIR6770-3 MIR6771 MIR6772 MIR6773 MIR6774 MIR6775 MIR6776
MIR6777 MIR6778 MIR6779 MIR6780A MIR6780B MIR6781 MIR6782 MIR6783 MIR6784 MIR6785 MIR6786
MIR6787 MIR6788 MIR6789 MIR6790 MIR6791 MIR6792 MIR6793 MIR6794 MIR6795 MIR6796 MIR6797
MIR6798 MIR6799 MIR6800 MIR6801 MIR6802 MIR6803 MIR6804 MIR6805 MIR6806 MIR6807 MIR6808
MIR6809 MIR6810 MIR6811 MIR6812 MIR6813 MIR6814 MIR6815 MIR6816 MIR6817 MIR6818 MIR6819
MIR6820 MIR6821 MIR6822 MIR6823 MIR6824 MIR6825 MIR6826 MIR6827 MIR6828 MIR6829 MIR6830
MIR6831 MIR6832 MIR6833 MIR6834 MIR6835 MIR6836 MIR6837 MIR6838 MIR6839 MIR6840 MIR6841
MIR6842 MIR6843 MIR6844 MIR6845 MIR6846 MIR6847 MIR6848 MIR6849 MIR6850 MIR6851 MIR6852
MIR6853 MIR6854 MIR6855 MIR6856 MIR6857 MIR6858 MIR6859-1 MIR6859-2 MIR6859-3 MIR6859-4
MIR6860 MIR6861 MIR6862-1 MIR6862-2 MIR6863 MIR6864 MIR6865 MIR6866 MIR6867 MIR6868
MIR6869 MIR6870 MIR6871 MIR6872 MIR6873 MIR6874 MIR6875 MIR6876 MIR6877 MIR6878 MIR6879
MIR6880 MIR6881 MIR6882 MIR6883 MIR6884 MIR6885 MIR6886 MIR6887 MIR6888 MIR6889 MIR6890
MIR6891 MIR6892 MIR6893 MIR6894 MIR6895 MIR708 MIR7-1 MIR7106 MIR7107 MIR7108 MIR7109
MIR711 MIR7110 MIR7111 MIR7112 MIR7113 MIR7114 MIR7150 MIR7151 MIR7152 MIR7153 MIR7154
MIR7155 MIR7156 MIR7157 MIR7158 MIR7159 MIR7160 MIR7161 MIR7162 MIR718 MIR7-2 MIR7-3

[0842]

MIR744 MIR7515 MIR758 MIR759 MIR760 MIR761 MIR762 MIR764 MIR7641-1 MIR7641-2 MIR765 MIR766
MIR767 MIR769 MIR770 MIR7702 MIR7703 MIR7704 MIR7705 MIR7706 MIR7843 MIR7844 MIR7845
MIR7846 MIR7847 MIR7848 MIR7849 MIR7850 MIR7851 MIR7852 MIR7853 MIR7854 MIR7855 MIR7856
MIR7973-1 MIR7973-2 MIR7974 MIR7975 MIR7976 MIR7977 MIR7978 MIR802 MIR8052 MIR8053 MIR8054
MIR8055 MIR8056 MIR8057 MIR8058 MIR8059 MIR8060 MIR8061 MIR8062 MIR8063 MIR8064 MIR8065
MIR8066 MIR8067 MIR8068 MIR8069-1 MIR8069-2 MIR8070 MIR8071-1 MIR8071-2 MIR8072 MIR8073
MIR8074 MIR8075 MIR8076 MIR8077 MIR8078 MIR8079 MIR8080 MIR8081 MIR8082 MIR8083 MIR8084
MIR8085 MIR8086 MIR8087 MIR8088 MIR8089 MIR8485 MIR873 MIR874 MIR875 MIR876 MIR877 MIR885
MIR887 MIR888 MIR889 MIR890 MIR891A MIR891B MIR892A MIR892B MIR892C MIR9-1 MIR9-2 MIR920
MIR921 MIR922 MIR924 MIR92A1 MIR92A2 MIR92B MIR93 MIR9-3 MIR933 MIR934 MIR935 MIR936
MIR937 MIR938 MIR939 MIR940 MIR941-1 MIR941-2 MIR941-3 MIR941-4 MIR941-5 MIR942 MIR943
MIR944 MIR95 MIR9500 MIR96 MIR98 MIR99A MIR99B MIRLET7A1 MIRLET7A2 MIRLET7A3
MIRLET7B MIRLET7C MIRLET7D MIRLET7E MIRLET7F1 MIRLET7F2 MIRLET7G MIRLET7I MID1IP1-
AS1 MIF-AS1 MIR100HG MIR124-2HG MIR133A1HG MIR137HG MIR143HG MIR155HG MIR17HG
MIR181A1HG MIR181A2HG MIR202HG MIR2052HG MIR210HG MIR217HG MIR222HG MIR222HG
MIR31HG MIR325HG MIR3663HG MIR381HG MIR3976HG MIR4435-2HG MIR4458HG MIR4500HG
MIR4697HG MIR497HG MIR503HG MIR600HG MIR646HG MIR663AHG MIR670HG MIR7-3HG
MIR7515HG MIR762HG MIR99AHG MIRLET7BHG MIRLET7DHG MIS18A-AS1 MT-LIPCAR MKN1-AS
MKNK1-AS1 MKRN3-AS1 MKX-AS1 MLIP-AS1 MLIP-IT1 MLK7-AS1 MLLT4-AS1 MME-AS1 MMP24-AS1
MMP25-AS1 MNX1-AS1 MORC1-AS1 MORC2-AS1 MORF4L2-AS1 MPRIP-AS1 MRGPRF-AS1 MRGPRG-
AS1 MROH7-TTC4 MRPL23-AS1 MRV11-AS1 MSC-AS1 MSH5-SAPCD1 MTOR-AS1 MTUS2-AS1 MTUS2-
AS2 MYB-AS1 MYCBP2-AS1 MYCBP2-AS2 MYCNOS MYCNUT MDS2 MYLK-AS1 MYLK-AS2 MYO16-
AS1 MYO16-AS2 MIAT MYHAS MHRT MYTIL-AS1 MZF1-AS1 N4BP2L2-IT2 NAALADL2-AS1
NAALADL2-AS2 NAALADL2-AS3 NADK2-AS1 NAGPA-AS1 NALCN-AS1 NAPA-AS1 NARF-IT1 NAV2-
AS1 NAV2-AS2 NAV2-AS3 NAV2-AS4 NAV2-IT1 NCAM1-AS1 NCBP2-AS1 NCBP2-AS2 NCK1-
AS1 NCKAP5-IT1 NCOA7-AS1 LOC104968399 NDFIP2-AS1 NDP-AS1 NDUFA6-AS1 NDUFB2-AS1
NDUFV2-AS1 NEBL-AS1 NRAV NRIR NEGR1-IT1 NBR2 NEURL1-AS1 NBAT1 NHEG1 NEXN-AS1 NFIA-
AS1 NFIA-AS2 NKILA NFYC-AS1 NHS-AS1 NIFK-AS1 NIPBL-AS1 NKX2-1-AS1 NKX2-2-AS1 NLGN1-AS1
NLGN4Y-AS1 NNT-AS1 NCRNA00250 NAMA NRON NCRUPAR NOP14-AS1 NPHP3-AS1 NPHP3-ACAD11
NPPA-AS1 NPSR1-AS1 NPTN-IT1 NR2F1-AS1 NR2F2-AS1 NREP-AS1 NRG1-IT1 NRG1-IT3 NRG3-AS1
NRSN2-AS1 NTM-IT NTRK3-AS1 NUCB1-AS1 NEAT1 NUP50-AS1 NUTM2A-AS1 NUTM2B-AS1 OCIAD1-
AS1 OGFR-AS1 OIP5-AS1 OLMALINC OPA1-AS1 OPCML-IT1 OPCML-IT2 OR2A1-AS1 OSBPL10-AS1
OSER1-AS1 OSGEPL1-AS1 OSMR-AS1 OTUD6B-AS1 OTX2-AS1 OVAAL OVCH1-AS1 OVOL1-AS1
OXCT1-AS1 P2RX5-TAX1BP3 P3H2-AS1 P4HA2-AS1 LOC104940763 PRG1 PABPC1L2B-AS1 PABPC5-AS1
PACRG-AS1 PAN3-AS1 PTCSC1 PTCSC2 PTCSC3 PAPPAA-AS1 PAPPAA-AS2 PAQR9-AS1 PARD3-AS1
PARD6G-AS1 PAUPAR PAX8-AS1 PAXBP1-AS1 PAXIP1-AS1 PAXIP1-AS2 PCBP1-AS1 PCBP2-OT1 PCCA-
AS1 PCDH9-AS1 PCDH9-AS2 PCDH9-AS3 PCDH9-AS4 PCED1B-AS1 PCGEM1 PCNA-AS1 PCOLCE-AS1
PCYT1B-AS1 PDCD4-AS1 PDX1-AS1 PDZRN3-AS1 PEG3-AS1 PEX5L-AS1 PEX5L-AS2 PGM5-AS1
PGM5P3-AS1 PGM5P4-AS1 PHEX-AS1 PHKA1-AS1 PHKA2-AS1 HPBP PGM5P3 PIK3CD-AS1 PIK3CD-AS2
PIK3IP1-AS1 PINK1-AS PIR-FIGF PITPNA-AS1 PITRM1-AS1 PKIA-AS1 PKN2-AS1 PKNOX2-AS1
PLA2G4E-AS1 PLBD1-AS1 PLCB1-IT1 PLCB2-AS1 PLCE1-AS1 PLCE1-AS2 PLCG1-AS1 PLCH1-AS1
PLCH1-AS2 PLCL2-AS1 PLCXD2-AS1 PLS1-AS1 PLS3-AS1 PLSCR5-AS1 PISRT1 POT1-AS1 POTEH-AS1
POU6F2-AS1 POU6F2-AS2 PPEF1-AS1 PPP1R26-AS1 PPP2R2B-IT1 PPP3CB-AS1 PPP4R1-AS1 PPT2-EGFL8
PWAR1 PWAR4 PWAR5 PWAR6 PWARN PWRN1 PWRN2 PWRN3 PWRN4 PRC1-AS1 PRH1-PRR4
PRICKLE2-AS1 PRICKLE2-AS2 PRICKLE2-AS3 PRNT PRKAG2-AS1 PRKAR2A-AS1 PRKCA-AS1 PRKCQ-
AS1 PRKG1-AS1 PRKX-AS1 PRMT5-AS1 LOC101054525 PRR26 PANDAR PARTICL PROSER2-AS1 PART1
PCA3 PRNCR1 PCAT1 PCAT14 PCAT18 PCAT19 PCAT2 PCAT29 PCAT4 PCAT6 PCAT7 LOC440313
PROX1-AS1 PRR34-AS1 PRR7-AS1 PRRT3-AS1 PRRX2-AS1 PSMA3-AS1 PSMB8-AS1 PSMD5-AS1 PSMD6-
AS2 PSMG3-AS1 PRINS PSORS1C3 PTCHD1-AS PTENP1-AS PTGES2-AS1 PACERR PTOV1-AS1 PTOV1-
AS2 PTPRD-AS1 PTPRD-AS2 PTPRG-AS1 PTPRJ-AS1 LOC101060632 LOC101926984 LOC151760
LOC100507556 PVRL3-AS1 PVT1 PXN-AS1 PYCARD-AS1 RAB11B-AS1 RAB30-AS1 RAB4B-EGLN2
RAB6C-AS1 RAD21-AS1 RAD51-AS1 RAD51L3-RFFL RAET1E-AS1 RAI1-AS1 RALY-AS1 RAMP2-AS1
RAP2C-AS1 RAPGEF4-AS1 RARA-AS1 RASA2-IT1 RASA3-IT1 RASAL2-AS1 RASGRF2-AS1 RASSF1-AS1
RASSF8-AS1 RBAKDN RBFADN RBM12B-AS1 RBM26-AS1 RBM5-AS1 RBMS3-AS1 RBMS3-AS2 RBMS3-
AS3 RBPMS-AS1 RCAN3AS RDH10-AS1 RERG-AS1 RERG-IT1 RBSG2 RFPL1S RFPL3S RFX3-AS1 RGMB-
AS1 RGPD4-AS1 RMST RHOXF1-AS1 RHPN1-AS1 RPPH1 RMDN2-AS1 RMRP RN7SL1 RN7SL2 RNY1

[0843]

RNY3 RNY4 RNY5 RNASEH1-AS1 RNASEH2B-AS1 RNASEK-C17orf49 RNF139-AS1 RNF144A-AS1 RNF157-AS1 RNF185-AS1 RNF216-IT1 RNF217-AS1 RNF219-AS1 ROPN1L-AS1 ROR1-AS1 RORA-AS1 RORA-AS2 RORB-AS1 RPARP-AS1 RPL34-AS1 RPS6KA2-AS1 RPS6KA2-IT1 RRS1-AS1 RSF1-IT1 RSF1-IT2 RTCA-AS1 RTEL1-TNFRSF6B RUNDC3A-AS1 RUNX1-IT1 RUVBL1-AS1 SACS-AS1 SAMD12-AS1 SAMSN1-AS1 SAP30L-AS1 SAPCD1-AS1 SATB1-AS1 SATB2-AS1 SBF2-AS1 SCAANT1 SCAMP1-AS1 SCEL-AS1 SCOC-AS1 SDCBP2-AS1 SEC24B-AS1 SEMA3B-AS1 SEMA6A-AS1 SALRNA1 SALRNA2 SALRNA3 SENP3-EIF4A1 SEPSECS-AS1 SEPT4-AS1 SEPT5-GP1BB SEPT7-AS1 SERF2-C15ORF63 SERTAD4-AS1 SFTPD-AS1 SGMS1-AS1 SGOL1-AS1 SH3BP5-AS1 SH3PXD2A-AS1 SH3RF3-AS1 SHANK2-AS1 SHANK2-AS2 SHANK2-AS3 SIAH2-AS1 SIDT1-AS1 SIRPG-AS1 SIX3-AS1 LOC101928202 SLC14A2-AS1 SLC16A1-AS1 SLC16A12-AS1 SLC25A21-AS1 SLC25A25-AS1 SLC25A30-AS1 SLC25A5-AS1 SLC26A4-AS1 SLC2A1-AS1 SLC39A12-AS1 SLC6A1-AS1 SLC7A11-AS1 SLC8A1-AS1 SLC9A9-AS1 SLCO4A1-AS1 SLFN1-AS1 SLIT1-AS1 SLIT2-IT1 SLMO2-ATP5E SLX1A-SULT1A3 SLX1B-SULT1A4 SMAD1-AS1 SMAD1-AS2 SMAD5-AS1 SMAD9-IT1 SCARNA1 SCARNA10 SCARNA11 SCARNA12 SCARNA13 SCARNA14 SCARNA15 SCARNA16 SCARNA17 SCARNA18 SCARNA2 SCARNA20 SCARNA21 SCARNA22 SCARNA23 SCARNA27 SCARNA3 SCARNA4 SCARNA5 SCARNA6 SCARNA7 SCARNA8 SCARNA9 SCARNA9L SMIM10L2A SMIM10L2B SNHG1 SNHG10 SNHG11 SNHG12 SNHG14 SNHG15 SNHG16 SNHG17 SNHG18 SNHG19 SNHG20 SNHG21 SNHG22 SNHG23 SNHG24 SNHG3 SNHG4 SNHG5 SNHG6 SNHG7 SNHG8 SNHG9 SMARCA5-AS1 SMC2-AS1 SMC5-AS1 SMG7-AS1 SMIM2-AS1 SMIM2-IT1 SMCR2 SMCR5 SMCR6 SENCN SNAI3-AS1 SNAP25-AS1 SNAP47-AS1 SNCA-AS1 SND1-IT1 SNRK-AS1 SOCS2-AS1 SORCS3-AS1 SOS1-IT1 SOX2-OT SOX21-AS1 SOX9-AS1 SP2-AS1 SPACA6P-AS SPAG5-AS1 SPANXA2-OT1 SPATA13-AS1 SPATA17-AS1 SPATA3-AS1 SPATA8-AS1 SPECC1L-ADORA2A SPACA6P SPATA41 SPATA42 SPG20-AS1 SPIN4-AS1 SFPQ SPRY4-IT1 SPTY2D1-AS1 SRD5A3-AS1 SRGAP2-AS1 SRGAP3-AS1 SRGAP3-AS2 SRGAP3-AS3 SRGAP3-AS4 SRP14-AS1 SRP54-AS1 SRRM2-AS1 SSBP3-AS1 SSSCA1-AS1 SSTR5-AS1 ST20-AS1 ST3GAL4-AS1 ST3GAL5-AS1 ST3GAL6-AS1 ST6GAL2-IT1 ST7-AS1 ST7-AS2 ST7-OT3 ST7-OT4 ST8SIA6-AS1 STAG3L5P-PVRIG2P-PILRB STAM-AS1 STARD13-AS STARD13-IT1 STARD4-AS1 STARD7-AS1 STAU2-AS1 STEAP2-AS1 STEAP3-AS1 STK24-AS1 STK4-AS1 STPG2-AS1 STX16-NPEPL1 STX17-AS1 STX18-AS1 STX18-IT1 STXBP5-AS1 SUCLA2-AS1 SUCLG2-AS1 SVIL-AS1 SCHLAP1 SYNE1-AS1 SYNJ2-IT1 SYNPR-AS1 SYP-AS1 SYS1-DBNDD2 SZT2-AS1 TRG-AS1 TAB3-AS2 TAF1A-AS1 TAPT1-AS1 TAT-AS1 TUG1 TBC1D22A-AS1 TBL1XR1-AS1 TBX2-AS1 TBX5-AS1 TCEAL3-AS1 TCEB3-AS1 TCL6 TCERGIL-AS1 TARID TCF7L1-IT1 TUNAR TERC TEN1-CDK3 TESC-AS1 TDRG1 TEX41 TSL TTTY1 TTTY10 TTTY11 TTTY12 TTTY13 TTTY13B TTTY14 TTTY15 TTTY16 TTTY17A TTTY17B TTTY17C TTTY18 TTTY19 TTTY19B TTTY2 TTTY20 TTTY21 TTTY21B TTTY22 TTTY23 TTTY23B TTTY2B TTTY3 TTTY3B TTTY4 TTTY4B TTTY4C TTTY5 TTTY6 TTTY6B TTTY7 TTTY7B TTTY8 TTTY8B TTTY9A TTTY9B TET2-AS1 TEX26-AS1 TEX36-AS1 TFAP2A-AS1 TGFA-IT1 TGFB2-AS1 TGFB2-OT1 THAP7-AS1 THAP9-AS1 THOC7-AS1 THRB-AS1 THRB-IT1 THSD4-AS1 THSD4-AS2 THUMPD3-AS1 THCAT126 TIPARP-AS1 TINCR TLR8-AS1 TLX1NB TM4SF1-AS1 TM4SF19-AS1 TM4SF19-TC1TEX1D2 TMC3-AS1 TMCC1-AS1 TMEM108-AS1 TMEM147-AS1 TMEM161B-AS1 TMEM212-AS1 TMEM212-IT1 TMEM220-AS1 TMEM246-AS1 TMEM254-AS1 TMEM256-PLSCR3 TMEM26-AS1 TMEM44-AS1 TMEM5-AS1 TMEM51-AS1 TMEM72-AS1 TMEM92-AS1 TMEM9B-AS1 TMLHE-AS1 TMPO-AS1 TMRSS4-AS1 TMX2-CTNND1 THRIL TNKS2-AS1 TNR-IT1 TNRC6C-AS1 TOB1-AS1 TOLLIP-AS1 TONSL-AS1 TOPORS-AS1 TP53TG1 TP73-AS1 TPRG1-AS1 TPRG1-AS2 TPT1-AS1 TRAF3IP2-AS1 TRAM2-AS1 TRERNA1 TMEM75 TMEM78 TRAPPC12-AS1 TRHDE-AS1 TRIM31-AS1 TRIM36-IT1 TRIM52-AS1 TRPC7-AS1 TRPM2-AS TSC22D1-AS1 TSIX TSNAX-DISC1 TSPAN9-IT1 TSPEAR-AS1 TSPEAR-AS2 TSSC1-IT1 TTC21B-AS1 TTC28-AS1 TTC3-AS1 TTC39A-AS1 TTC39C-AS1 TTLL7-IT1 TTN-AS1 TUB-AS1 TP53COR1 TUSC7 TUSC8 TSG1 TXNDC12-AS1 UBA6-AS1 UBAC2-AS1 UBE2E1-AS1 UBE2F-SCLY UBE2Q1-AS1 UBE2R2-AS1 UBL7-AS1 UBOX5-AS1 UBR5-AS1 UBXN10-AS1 UBXN7-AS1 UCHL1-AS1 UCKL1-AS1 UFL1-AS1 UGDH-AS1 UMODL1-AS1 UNC5B-AS1 RNR2 16S rRNA 16S rRNA RNA18S5 RNA28S5 RNA45S5 RNA5-8S5 RNA5S1 RNA5S10 RNA5S11 RNA5S12 RNA5S13 RNA5S14 RNA5S15 RNA5S16 RNA5S17 RNA5S2 RNA5S3 RNA5S4 RNA5S5 RNA5S6 RNA5S7 RNA5S8 RNA5S9 RNR1 12S rRNA 12S rRNA RNU105B RNU105C RNU86 SNORD10 SNORD100 SNORD101 SNORD102 SNORD103A SNORD103B SNORD104 SNORD105 SNORD105B SNORD107 SNORD108 SNORD109A SNORD109B SNORD11 SNORD110 SNORD111 SNORD111B SNORD112 SNORD113-1 SNORD113-2 SNORD113-3 SNORD113-4 SNORD113-5 SNORD113-6 SNORD113-7 SNORD113-8 SNORD113-9 SNORD114-1 SNORD114-10 SNORD114-11 SNORD114-12 SNORD114-13 SNORD114-14 SNORD114-15 SNORD114-16 SNORD114-17 SNORD114-18 SNORD114-19 SNORD114-2 SNORD114-20 SNORD114-21 SNORD114-22 SNORD114-23 SNORD114-24 SNORD114-25 SNORD114-26 SNORD114-27 SNORD114-28 SNORD114-29

[0844]

SNORD114-3 SNORD114-30 SNORD114-31 SNORD114-4 SNORD114-5 SNORD114-6 SNORD114-7
 SNORD114-8 SNORD114-9 SNORD115-1 SNORD115-10 SNORD115-11 SNORD115-12 SNORD115-13
 SNORD115-14 SNORD115-15 SNORD115-16 SNORD115-17 SNORD115-18 SNORD115-19 SNORD115-2
 SNORD115-20 SNORD115-21 SNORD115-22 SNORD115-23 SNORD115-24 SNORD115-25 SNORD115-26
 SNORD115-27 SNORD115-28 SNORD115-29 SNORD115-3 SNORD115-30 SNORD115-31 SNORD115-32
 SNORD115-33 SNORD115-34 SNORD115-35 SNORD115-36 SNORD115-37 SNORD115-38 SNORD115-39
 SNORD115-4 SNORD115-40 SNORD115-41 SNORD115-42 SNORD115-43 SNORD115-44 SNORD115-45
 SNORD115-46 SNORD115-47 SNORD115-48 SNORD115-5 SNORD115-6 SNORD115-7 SNORD115-8
 SNORD115-9 SNORD116-1 SNORD116-10 SNORD116-11 SNORD116-12 SNORD116-13 SNORD116-14
 SNORD116-15 SNORD116-16 SNORD116-17 SNORD116-18 SNORD116-19 SNORD116-2 SNORD116-20
 SNORD116-21 SNORD116-22 SNORD116-23 SNORD116-24 SNORD116-25 SNORD116-26 SNORD116-27
 SNORD116-28 SNORD116-29 SNORD116-3 SNORD116-30 SNORD116-4 SNORD116-5 SNORD116-6
 SNORD116-7 SNORD116-8 SNORD116-9 SNORD117 SNORD118 SNORD119 SNORD11B SNORD12
 SNORD121A SNORD121B SNORD123 SNORD124 SNORD125 SNORD126 SNORD127 SNORD12B
 SNORD12C SNORD13 SNORD14A SNORD14B SNORD14C SNORD14D SNORD14E SNORD15A
 SNORD15B SNORD16 SNORD17 SNORD18A SNORD18B SNORD18C SNORD19 SNORD19B SNORD1A
 SNORD1B SNORD1C SNORD2 SNORD20 SNORD21 SNORD22 SNORD23 SNORD24 SNORD25 SNORD26
 SNORD27 SNORD28 SNORD29 SNORD30 SNORD31 SNORD32A SNORD32B SNORD33 SNORD34
 SNORD35A SNORD35B SNORD36A SNORD36B SNORD36C SNORD37 SNORD38A SNORD38B SNORD3A
 SNORD3B-1 SNORD3B-2 SNORD3C SNORD3D SNORD41 SNORD42A SNORD42B SNORD43 SNORD44
 SNORD45A SNORD45B SNORD45C SNORD46 SNORD47 SNORD48 SNORD49A SNORD49B SNORD4A
 SNORD4B SNORD5 SNORD50A SNORD50B SNORD51 SNORD52 SNORD53 SNORD54 SNORD55
 SNORD56 SNORD56B SNORD57 SNORD58A SNORD58B SNORD58C SNORD59A SNORD59B SNORD6
 SNORD60 SNORD61 SNORD62A SNORD62B SNORD63 SNORD64 SNORD65 SNORD66 SNORD67
 SNORD68 SNORD69 SNORD7 SNORD70 SNORD71 SNORD72 SNORD73A SNORD74 SNORD75 SNORD76
 SNORD77 SNORD78 SNORD79 SNORD8 SNORD80 SNORD81 SNORD82 SNORD83A SNORD83B
 SNORD84 SNORD85 SNORD86 SNORD87 SNORD88A SNORD88B SNORD88C SNORD89 SNORD9
 SNORD90 SNORD91A SNORD91B SNORD92 SNORD93 SNORD94 SNORD95 SNORD96A SNORD96B
 SNORD97 SNORD98 SNORD99 SNORA1 SNORA10 SNORA11 SNORA11B SNORA11C SNORA11D
 SNORA11E SNORA12 SNORA13 SNORA14A SNORA14B SNORA15 SNORA16A SNORA16B SNORA17
 SNORA18 SNORA19 SNORA20 SNORA21 SNORA22 SNORA23 SNORA24 SNORA25 SNORA26 SNORA27
 SNORA28 SNORA29 SNORA2A SNORA2B SNORA30 SNORA31 SNORA32 SNORA33 SNORA34 SNORA35
 SNORA36A SNORA36B SNORA36C SNORA37 SNORA38 SNORA38B SNORA4 SNORA40 SNORA41
 SNORA43 SNORA44 SNORA45A SNORA45B SNORA46 SNORA47 SNORA48 SNORA49 SNORA51
 SNORA52 SNORA53 SNORA54 SNORA55 SNORA56 SNORA57 SNORA58 SNORA59A SNORA59B
 SNORA5A SNORA5B SNORA5C SNORA6 SNORA60 SNORA61 SNORA62 SNORA63 SNORA64 SNORA65
 SNORA66 SNORA67 SNORA68 SNORA69 SNORA70 SNORA70B SNORA70C SNORA70D SNORA70E
 SNORA70F SNORA70G SNORA71A SNORA71B SNORA71C SNORA71D SNORA71E SNORA72
 SNORA73A SNORA73B SNORA74A SNORA74B SNORA75 SNORA76A SNORA76C SNORA77 SNORA78
 SNORA79 SNORA7A SNORA7B SNORA8 SNORA80A SNORA80B SNORA80E SNORA81 SNORA84
 SNORA9 RN7SK RNU1-1 RNU1-13P RNU1-2 RNU1-27P RNU1-28P RNU1-3 RNU1-4 RNU11 RNU12 RNU2-1
 RNU2-2P RNU4-1 RNU4-2 RNU4ATAC RNU5A-1 RNU5B-1 RNU5D-1 RNU5E-1 RNU5F-1 RNU6-1 RNU6-
 10P RNU6-14P RNU6-15P RNU6-16P RNU6-19P RNU6-2 RNU6-21P RNU6-23P RNU6-26P RNU6-28P RNU6-
 30P RNU6-31P RNU6-33P RNU6-34P RNU6-35P RNU6-36P RNU6-39P RNU6-42P RNU6-45P RNU6-46P
 RNU6-48P RNU6-52P RNU6-53P RNU6-55P RNU6-56P RNU6-57P RNU6-58P RNU6-59P RNU6-63P RNU6-
 64P RNU6-66P RNU6-67P RNU6-68P RNU6-69P RNU6-7 RNU6-71P RNU6-72P RNU6-75P RNU6-76P RNU6-
 78P RNU6-79P RNU6-8 RNU6-81P RNU6-82P RNU6-83P RNU6-9 RNU6ATAC RNU7-1 RNVU1-1 RNVU1-14
 RNVU1-15 RNVU1-17 RNVU1-18 RNVU1-19 RNVU1-20 RNVU1-3 RNVU1-4 RNVU1-6 RNVU1-7 RNVU1-8
 SNAR-A1 SNAR-A10 SNAR-A11 SNAR-A12 SNAR-A13 SNAR-A14 SNAR-A2 SNAR-A3 SNAR-A4 SNAR-
 A5 SNAR-A6 SNAR-A7 SNAR-A8 SNAR-A9 SNAR-B1 SNAR-B2 SNAR-C1 SNAR-C2 SNAR-C3 SNAR-C4
 SNAR-C5 SNAR-D SNAR-E SNAR-F SNAR-G1 SNAR-G2 SNAR-H SNAR-I NMTRQ-TTG14-1 NMTRQ-
 TTG3-1 NMTRQ-TTG5-1 NMTRL-TAA1-1 NMTRL-TAA4-1 NMTRS-TGA1-1 TRNAA-AGC TRNAA-CGC
 TRNAA-UGC TRR TRNAR-ACG TRNAR-CCG TRNAR-CCU TRNAR-UCG TRNAR-UCU TRNAN-GUU
 TRNAD-GUC TRNAC-GCA TRNAE-CUC TRNAE-UUC TRNAQ-CUG TRNAQ-UUG TRNAG-CCC TRNAG-
 GCC TRNAG-UCC TRNAH-GUG TRNAI-AAU TRNAI-GAU TRNAI-UAU TRNAL-AAG TRNAL-CAA
 TRNAL-CAG TRNAL-UAA TRNAL-UAG TRNAK-CUU TRNAK-UUU TRNAM-CAU TRNASTOP-UUA

[0845]

TRNASTOP-UCA TRNAF-GAA TRNAP-AGG TRNAP-CGG TRNAP-UGG TRNAS-AGA TRNAS-CGA TRNAS-GCU TRNAS-UGA TRSUP-CTA1-1 TRSUP-TTA1-1 TRSUP-TTA2-1 TRNAT-AGU TRNAT-CGU TRNAT-UGU TRNAW-CCA TRNAY-AUA TRNAY-GUA TRNAV-AAC TRNAV-CAC TRNAV-UAC TRA-AGC10-1 TRA-AGC1-1 TRA-AGC11-1 TRA-AGC12-1 TRA-AGC12-2 TRA-AGC12-3 TRA-AGC13-1 TRA-AGC13-2 TRA-AGC14-1 TRA-AGC15-1 TRA-AGC16-1 TRA-AGC17-1 TRA-AGC18-1 TRA-AGC18-2 TRA-AGC19-1 TRA-AGC20-1 TRA-AGC2-1 TRA-AGC21-1 TRA-AGC2-2 TRA-AGC22-1 TRA-AGC3-1 TRA-AGC4-1 TRA-AGC5-1 TRA-AGC6-1 TRA-AGC7-1 TRA-AGC8-1 TRA-AGC8-2 TRA-AGC9-1 TRA-AGC9-2 TRA-CGC1-1 TRA-CGC2-1 TRA-CGC3-1 TRA-CGC4-1 TRA-CGC5-1 TRA-TGC1-1 TRA-TGC2-1 TRA-TGC3-1 TRA-TGC3-2 TRA-TGC4-1 TRA-TGC5-1 TRA-TGC6-1 TRA-TGC7-1 TRA-TGC8-1 TRR-ACG1-1 TRR-ACG1-2 TRR-ACG1-3 TRR-ACG2-1 TRR-ACG2-2 TRR-ACG2-3 TRR-ACG2-4 TRR-CCG1-1 TRR-CCG1-2 TRR-CCG1-3 TRR-CCG2-1 TRR-CCT1-1 TRR-CCT2-1 TRR-CCT3-1 TRR-CCT4-1 TRR-CCT5-1 TRR-TCG1-1 TRR-TCG2-1 TRR-TCG3-1 TRR-TCG4-1 TRR-TCG5-1 TRR-TCG6-1 TRR-TCT1-1 TRR-TCT2-1 TRR-TCT3-1 TRR-TCT3-2 TRR-TCT4-1 TRR-TCT5-1 TRN-ATT1-1 TRN-ATT1-2 TRN-GTT10-1 TRN-GTT1-1 TRN-GTT11-1 TRN-GTT11-2 TRN-GTT12-1 TRN-GTT13-1 TRN-GTT14-1 TRN-GTT15-1 TRN-GTT16-1 TRN-GTT16-2 TRN-GTT16-3 TRN-GTT16-4 TRN-GTT16-5 TRN-GTT17-1 TRN-GTT18-1 TRN-GTT19-1 TRN-GTT20-1 TRN-GTT2-1 TRN-GTT21-1 TRN-GTT2-2 TRN-GTT2-3 TRN-GTT2-4 TRN-GTT2-5 TRN-GTT2-6 TRN-GTT3-1 TRN-GTT3-2 TRN-GTT4-1 TRN-GTT5-1 TRN-GTT6-1 TRN-GTT7-1 TRN-GTT8-1 TRN-GTT9-1 TRN-GTT9-2 TRD-GTC1-1 TRD-GTC2-1 TRD-GTC2-10 TRD-GTC2-11 TRD-GTC2-2 TRD-GTC2-3 TRD-GTC2-4 TRD-GTC2-5 TRD-GTC2-6 TRD-GTC2-7 TRD-GTC2-8 TRD-GTC2-9 TRD-GTC3-1 TRD-GTC4-1 TRD-GTC5-1 TRD-GTC6-1 TRD-GTC7-1 TRD-GTC8-1 TRD-GTC9-1 TRC-GCA10-1 TRC-GCA1-1 TRC-GCA11-1 TRC-GCA12-1 TRC-GCA13-1 TRC-GCA14-1 TRC-GCA15-1 TRC-GCA16-1 TRC-GCA17-1 TRC-GCA18-1 TRC-GCA19-1 TRC-GCA20-1 TRC-GCA2-1 TRC-GCA21-1 TRC-GCA2-2 TRC-GCA22-1 TRC-GCA2-3 TRC-GCA23-1 TRC-GCA2-4 TRC-GCA24-1 TRC-GCA3-1 TRC-GCA4-1 TRC-GCA5-1 TRC-GCA6-1 TRC-GCA7-1 TRC-GCA8-1 TRC-GCA9-1 TRC-GCA9-2 TRC-GCA9-3 TRC-GCA9-4 TRQ-CTG10-1 TRQ-CTG1-1 TRQ-CTG1-2 TRQ-CTG12-1 TRQ-CTG1-3 TRQ-CTG1-4 TRQ-CTG14-1 TRQ-CTG15-1 TRQ-CTG15-2 TRQ-CTG17-1 TRQ-CTG18-1 TRQ-CTG2-1 TRQ-CTG3-1 TRQ-CTG3-2 TRQ-CTG4-1 TRQ-CTG4-2 TRQ-CTG5-1 TRQ-CTG6-1 TRQ-CTG7-1 TRQ-CTG8-1 TRQ-CTG8-2 TRQ-TTG10-1 TRQ-TTG1-1 TRQ-TTG2-1 TRQ-TTG3-1 TRQ-TTG3-2 TRQ-TTG3-3 TRQ-TTG4-1 TRQ-TTG6-1 TRE-CTC1-1 TRE-CTC1-2 TRE-CTC1-3 TRE-CTC1-4 TRE-CTC1-5 TRE-CTC1-6 TRE-CTC1-7 TRE-CTC17-1 TRE-CTC2-1 TRE-CTC3-1 TRE-CTC5-1 TRE-CTC6-1 TRE-CTC8-1 TRE-TTC1-1 TRE-TTC1-2 TRE-TTC1-3 TRE-TTC12-1 TRE-TTC13-1 TRE-TTC16-1 TRE-TTC2-1 TRE-TTC2-2 TRE-TTC3-1 TRE-TTC4-1 TRE-TTC4-2 TRE-TTC5-1 TRE-TTC8-1 TRG-CCC1-1 TRG-CCC1-2 TRG-CCC2-1 TRG-CCC2-2 TRG-CCC3-1 TRG-CCC5-1 TRG-CCC8-1 TRG-GCC1-1 TRG-GCC1-2 TRG-GCC1-3 TRG-GCC1-4 TRG-GCC1-5 TRG-GCC2-1 TRG-GCC2-2 TRG-GCC2-3 TRG-GCC2-4 TRG-GCC2-5 TRG-GCC3-1 TRG-GCC4-1 TRG-GCC5-1 TRG-GCC6-1 TRG-TCC1-1 TRG-TCC2-1 TRG-TCC2-2 TRG-TCC2-3 TRG-TCC2-4 TRG-TCC2-5 TRG-TCC2-6 TRG-TCC3-1 TRG-TCC4-1 TRH-GTG1-1 TRH-GTG1-2 TRH-GTG1-3 TRH-GTG1-4 TRH-GTG1-5 TRH-GTG1-6 TRH-GTG1-7 TRH-GTG1-8 TRH-GTG1-9 TRH-GTG2-1 TRH-GTG3-1 TRI-AAT1-1 TRI-AAT2-1 TRI-AAT3-1 TRI-AAT4-1 TRI-AAT5-1 TRI-AAT5-2 TRI-AAT5-3 TRI-AAT5-4 TRI-AAT5-5 TRI-AAT6-1 TRI-AAT7-1 TRI-AAT7-2 TRI-AAT8-1 TRI-AAT9-1 TRI-GAT1-1 TRI-GAT1-2 TRI-GAT1-3 TRI-TAT1-1 TRI-TAT2-1 TRI-TAT2-2 TRI-TAT2-3 TRI-TAT3-1 TRX-CAT1-1 TRX-CAT1-2 TRX-CAT1-3 TRX-CAT1-4 TRX-CAT1-5 TRX-CAT1-6 TRX-CAT1-7 TRX-CAT1-8 TRX-CAT2-1 TRX-CAT3-1 TRL-AAG1-1 TRL-AAG1-2 TRL-AAG1-3 TRL-AAG2-1 TRL-AAG2-2 TRL-AAG2-3 TRL-AAG2-4 TRL-AAG3-1 TRL-AAG4-1 TRL-AAG5-1 TRL-AAG6-1 TRL-AAG8-1 TRL-CAA1-1 TRL-CAA1-2 TRL-CAA2-1 TRL-CAA3-1 TRL-CAA4-1 TRL-CAA5-1 TRL-CAA6-1 TRL-CAG1-1 TRL-CAG1-2 TRL-CAG1-3 TRL-CAG1-4 TRL-CAG1-5 TRL-CAG1-6 TRL-CAG1-7 TRL-CAG2-1 TRL-CAG2-2 TRL-CAG3-1 TRL-TAA1-1 TRL-TAA2-1 TRL-TAA3-1 TRL-TAA4-1 TRL-TAA5-1 TRL-TAG1-1 TRL-TAG2-1 TRL-TAG3-1 TRK-CTT10-1 TRK-CTT1-1 TRK-CTT11-1 TRK-CTT1-2 TRK-CTT15-1 TRK-CTT2-1 TRK-CTT2-2 TRK-CTT2-3 TRK-CTT2-4 TRK-CTT2-5 TRK-CTT3-1 TRK-CTT4-1 TRK-CTT5-1 TRK-CTT6-1 TRK-CTT8-1 TRK-CTT9-1 TRK-TTT1-1 TRK-TTT11-1 TRK-TTT12-1 TRK-TTT16-1 TRK-TTT2-1 TRK-TTT3-1 TRK-TTT3-2 TRK-TTT3-3 TRK-TTT3-4 TRK-TTT3-5 TRK-TTT4-1 TRK-TTT5-1 TRK-TTT6-1 TRK-TTT7-1 TRK-TTT8-1 TRK-TTT9-1 TRM-CAT1-1 TRM-CAT2-1 TRM-CAT3-1 TRM-CAT3-2 TRM-CAT4-1 TRM-CAT4-2 TRM-CAT4-3 TRM-CAT5-1 TRM-CAT6-1 TRM-CAT7-1 TRF-GAA1-1 TRF-GAA1-2 TRF-GAA1-3 TRF-GAA1-4 TRF-GAA1-5 TRF-GAA1-6 TRF-GAA2-1 TRF-GAA3-1 TRF-GAA4-1 TRF-GAA5-1 TRF-GAA6-1 TRF-GAA7-1 TRP-AGG1-1 TRP-AGG2-1 TRP-AGG2-2 TRP-AGG2-3 TRP-AGG2-4 TRP-AGG2-5 TRP-AGG2-6 TRP-AGG2-7 TRP-AGG2-8 TRP-AGG3-1 TRP-CGG1-1 TRP-CGG1-2 TRP-CGG1-3 TRP-CGG2-1 TRP-TGG1-1 TRP-TGG2-1 TRP-TGG3-1 TRP-TGG3-2 TRP-TGG3-3 TRP-TGG3-4 TRP-TGG3-5 TRU-TCA1-1 TRU-TCA2-1 TRU-TCA3-1 TRS-AGA1-1 TRS-AGA2-1 TRS-AGA2-2 TRS-AGA2-3

[0846]

TRS-AGA2-4 TRS-AGA2-5 TRS-AGA2-6 TRS-AGA3-1 TRS-AGA4-1 TRS-AGA5-1 TRS-AGA6-1 TRS-CGA1-1 TRS-CGA2-1 TRS-CGA3-1 TRS-CGA4-1 TRS-GCT1-1 TRS-GCT2-1 TRS-GCT3-1 TRS-GCT4-1 TRS-GCT4-2 TRS-GCT4-3 TRS-GCT5-1 TRS-GCT6-1 TRS-TGA1-1 TRS-TGA2-1 TRS-TGA3-1 TRS-TGA4-1 TRT-AGT1-1 TRT-AGT1-2 TRT-AGT1-3 TRT-AGT2-1 TRT-AGT2-2 TRT-AGT3-1 TRT-AGT4-1 TRT-AGT5-1 TRT-AGT6-1 TRT-AGT7-1 TRT-CGT1-1 TRT-CGT2-1 TRT-CGT3-1 TRT-CGT4-1 TRT-CGT5-1 TRT-CGT6-1 TRT-TGT1-1 TRT-TGT2-1 TRT-TGT3-1 TRT-TGT4-1 TRT-TGT5-1 TRT-TGT6-1 TRW-CCA1-1 TRW-CCA2-1 TRW-CCA3-1 TRW-CCA3-2 TRW-CCA3-3 TRW-CCA4-1 TRW-CCA5-1 TRW-CCA6-1 TRW-CCA7-1 TRY-ATA1-1 TRY-GTA10-1 TRY-GTA1-1 TRY-GTA2-1 TRY-GTA3-1 TRY-GTA4-1 TRY-GTA5-1 TRY-GTA5-2 TRY-GTA5-3 TRY-GTA5-4 TRY-GTA5-5 TRY-GTA6-1 TRY-GTA7-1 TRY-GTA8-1 TRY-GTA9-1 TRV-AAC1-1 TRV-AAC1-2 TRV-AAC1-3 TRV-AAC1-4 TRV-AAC1-5 TRV-AAC2-1 TRV-AAC3-1 TRV-AAC4-1 TRV-AAC5-1 TRV-AAC6-1 TRV-AAC7-1 TRV-CAC10-1 TRV-CAC1-1 TRV-CAC11-1 TRV-CAC1-2 TRV-CAC12-1 TRV-CAC1-3 TRV-CAC1-4 TRV-CAC1-5 TRV-CAC1-6 TRV-CAC2-1 TRV-CAC3-1 TRV-CAC4-1 TRV-CAC5-1 TRV-CAC6-1 TRV-CAC7-1 TRV-CAC8-1 TRV-CAC9-1 TRV-TAC1-1 TRV-TAC1-2 TRV-TAC2-1 TRV-TAC3-1 TRV-TAC4-1 TRNC TRNA TRND TRNE TRNF TRNG TRNH TRNI TRNK TRNL1 TRNL2 TRNM TRNN TRNP TRNQ TRNR TRNS1 TRNS2 TRNT TRNV TRNW TRNY trnT trnE trnL trnS trnH trnR trnG trnK trnS trnD trnY trnC trnL trnF trnP trnV trnN trnW trnA trnQ trnM trnI trnF trnV trnL trnS trnK trnG trnT trnI trnW trnR trnH trnE trnC trnY trnM trnS trnQ trnL trnD trnP trnA TRNAG1

[0847]

[0848] [표 13]

[0849] 성숙 적혈구 세포에서의 세포 표면 마커

[0850]

단계	마커			
	GPA-양성	Alpha4 인테그린-양성	Band3-양성	Alpha4 인테그린-양성 및 Band3-양성
M0	83.9%	98.0%	54.6%	52.9%
M3	99.0%	91.4%	97.8%	89.6%
M5	99.5%	84.2%	100%	84.2%

[0851] [표 14]

[0852] EGFP 및 mCherry의 공동-발현

[0853]

단계	하기에 양성인 세포 백분율		
	EGFP 단독	mCherry 단독	EGFP 및 mCherry
M6	90.4%	89.05%	86.55%
M11	77.75%	75.90%	66.05%
M13	86.00%	80.30%	75.40%
M18	94.15%	90.80%	86.40%

[0854] [표 15]

[0855] 4-1BBL 및 아벨루맙의 공동-발현

[0856]

샘플	하기에 양성인 세포 백분율		
	4-1BBL	아벨루맙	4-1BBL 및 아벨루맙
음성 대조군	0.99%	0.24%	0.035%
적혈구 세포 + m4-1BBL 단독	92.5%	0.58%	0.39%
적혈구 세포 + 아벨루맙 단독	1.4%	75.0%	0.59%
적혈구 세포 + m4-1BBL 및 아벨루맙	61.4%	70.9%	58.5%

[0857] [표 16]

[0858] 용량 발현 결과

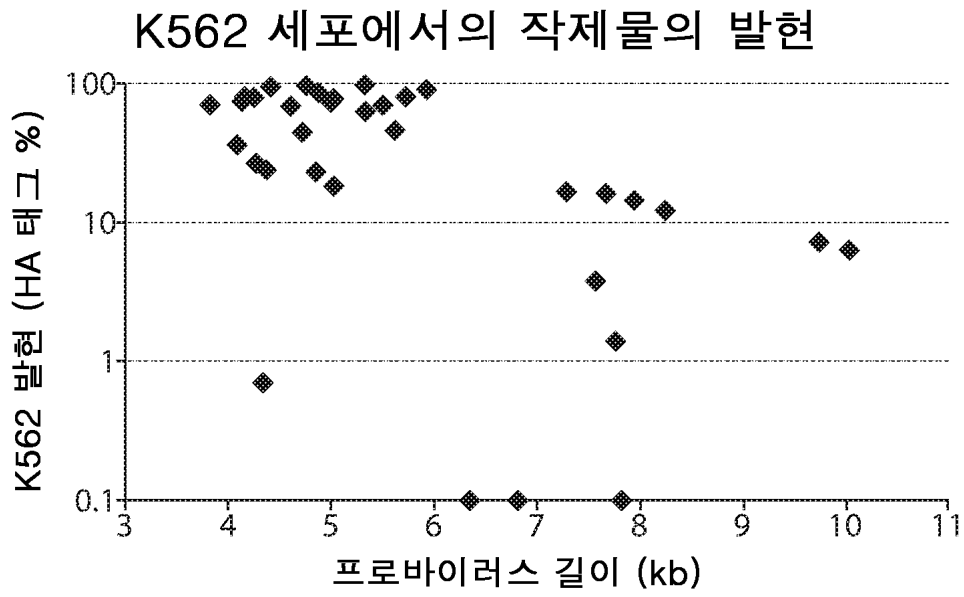
[0859]

첨가된 mRNA 양 (mg)	4-1BBL 을 발현하는 세포의 백분율	세포 당 4-1BBL 의 카피수
0.6	87.5%	1,015,250
0.4	90.6%	874,017
0.2	92.0%	609,145
0.1	91.75%	274,766
0.05	87.7%	100,500
0.025	74.0%	42,902
0	1.25%	NA

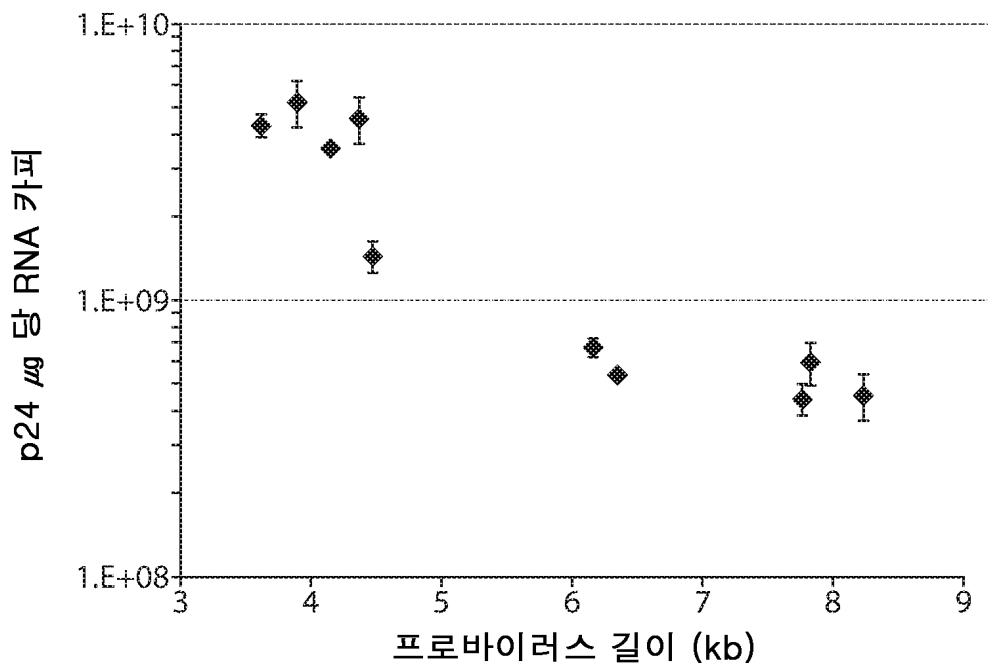
[0860] 전술한 본 발명은 이해의 명확함의 목적상 예시 및 예로 다소 상세히 기재되었으나, 첨부된 청구항의 사상 또는 범위로부터 벗어남이 없이 이에 대해 특정한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음이 본 발명의 교시내용에 비추어 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

도면

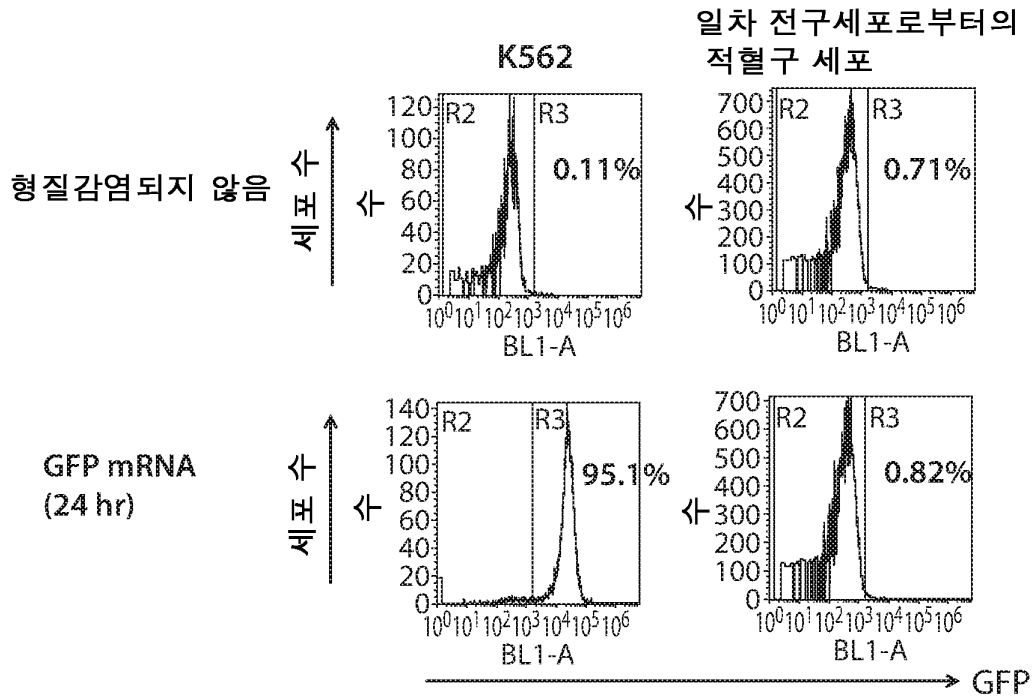
도면1



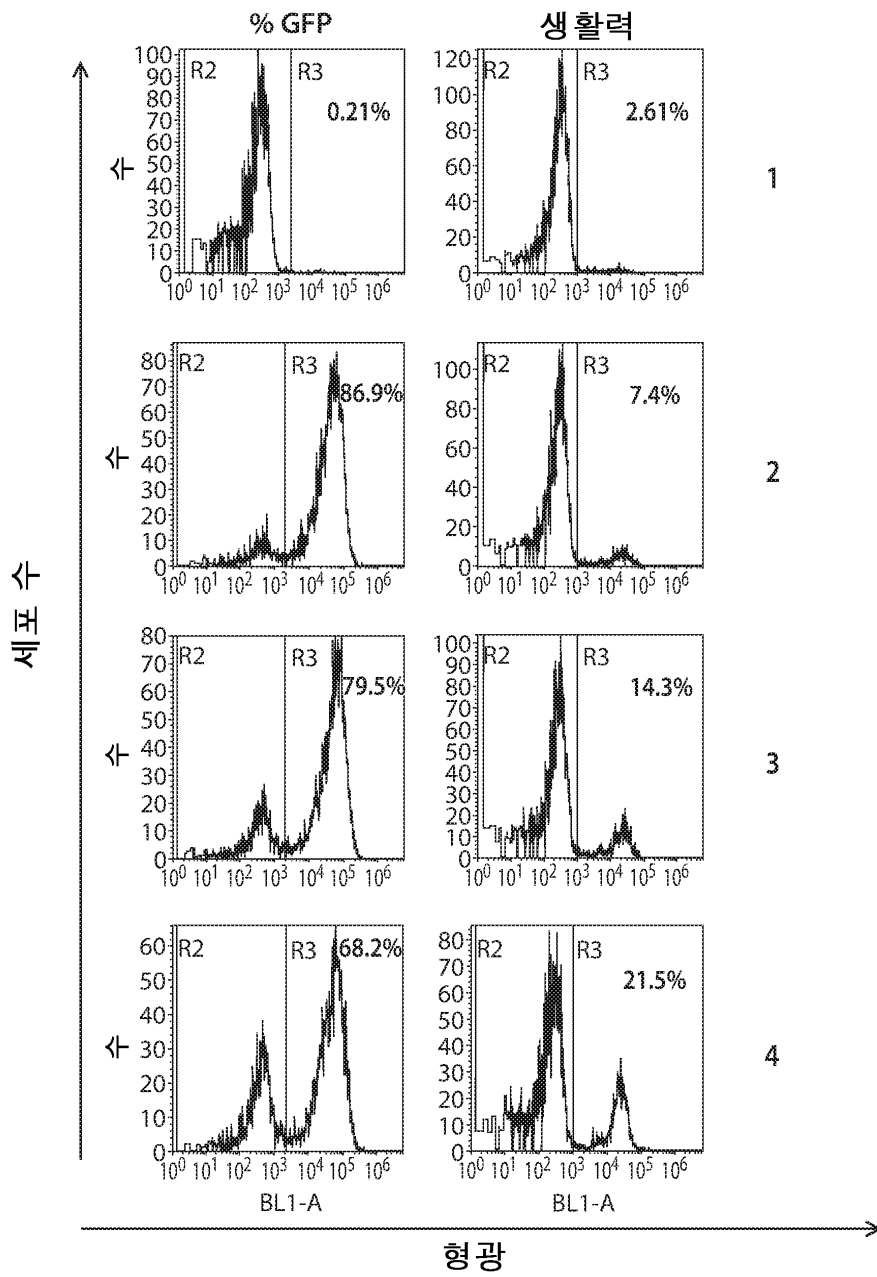
도면2



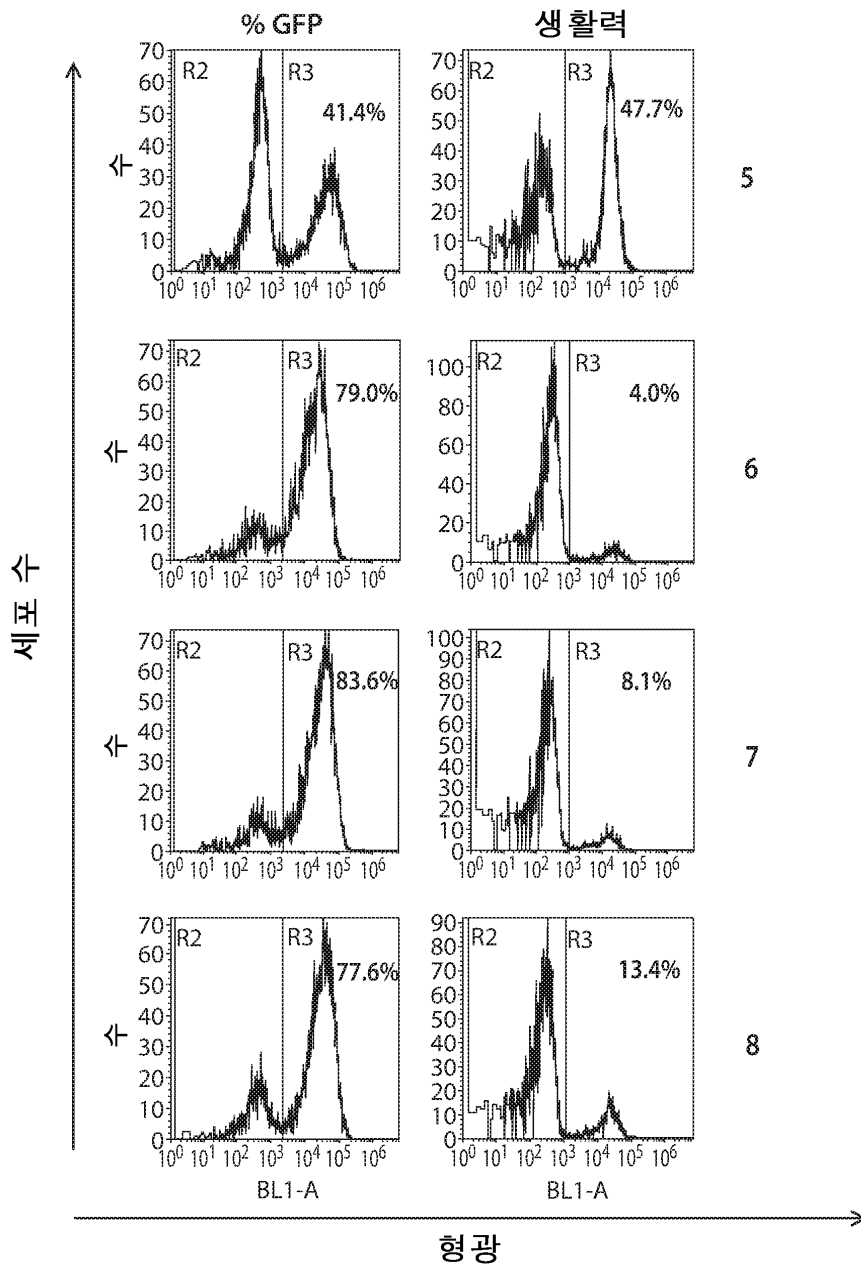
도면3



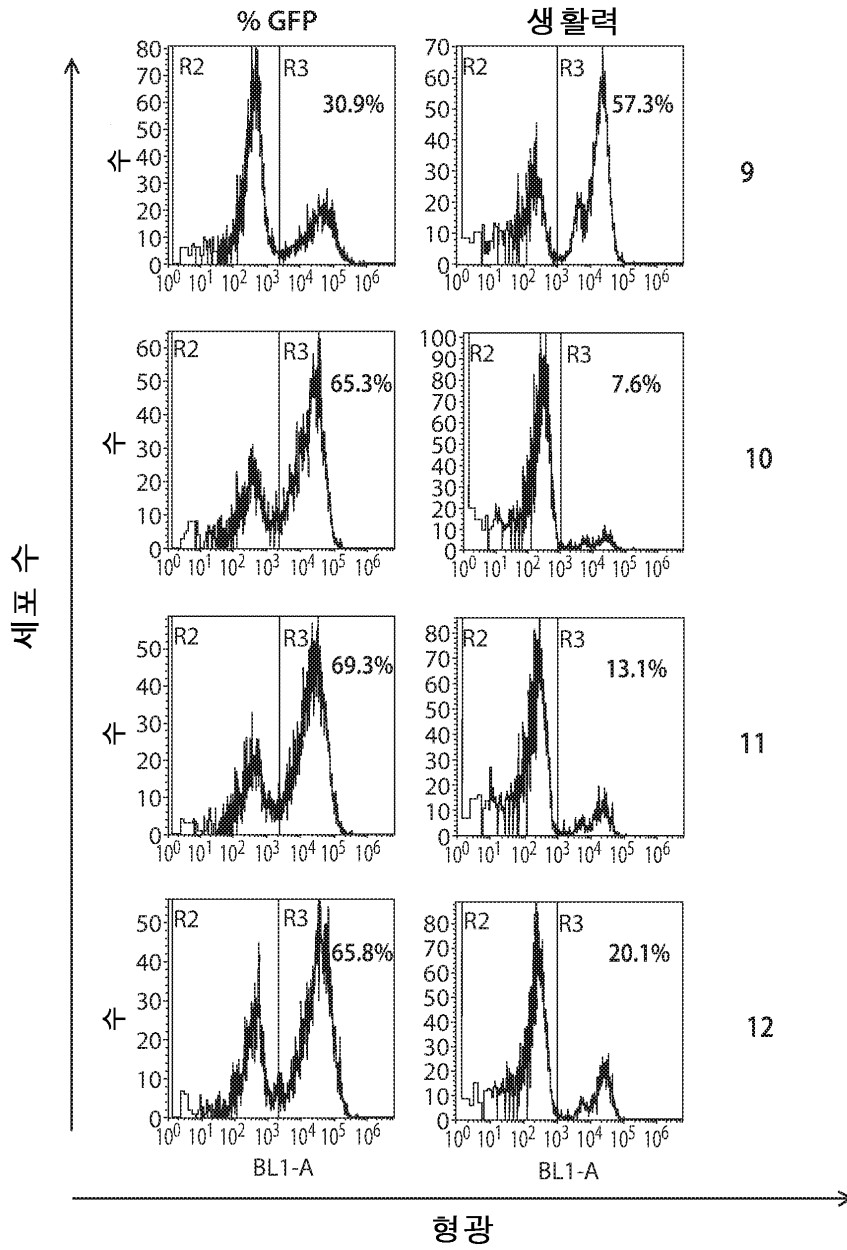
도면4a



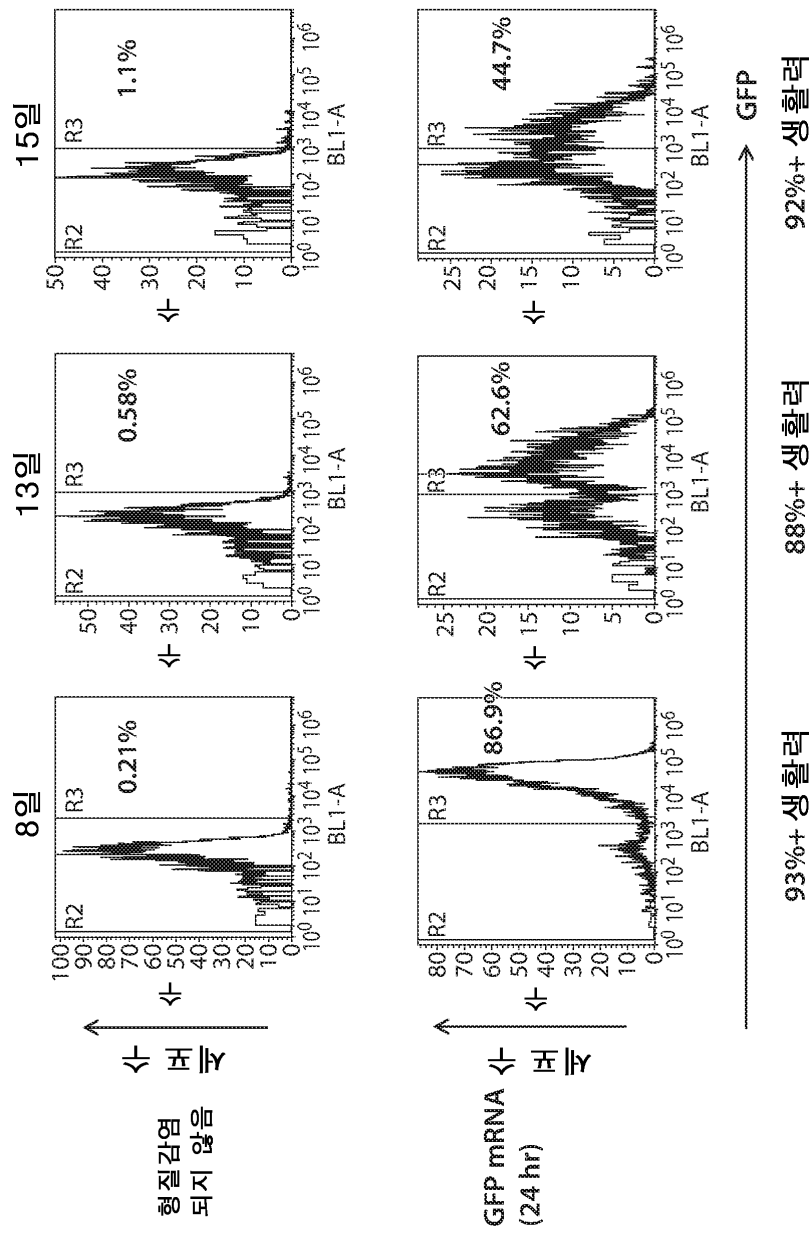
도면4b



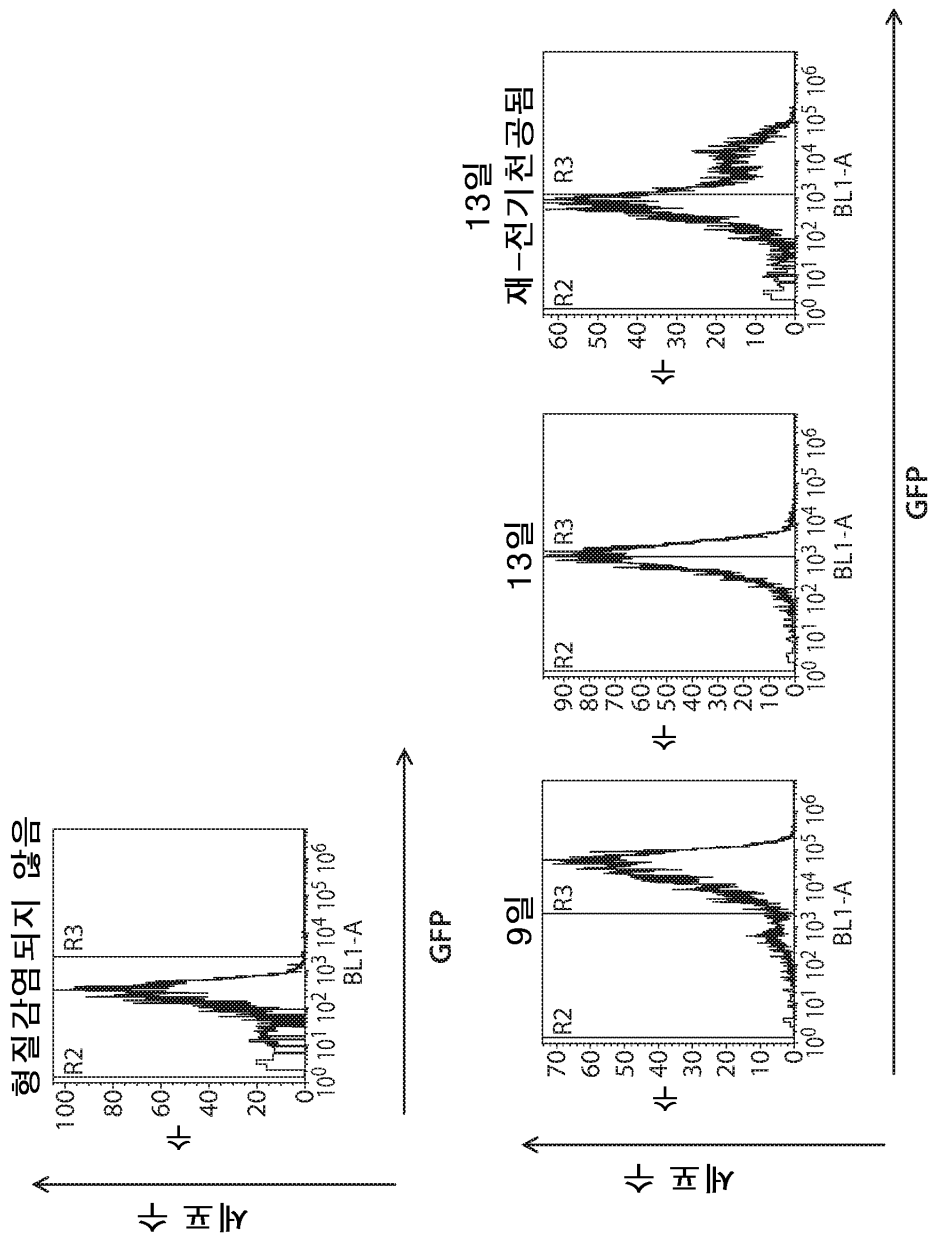
도면4c



도면5



도면6



형질감염되지 않음

세포수

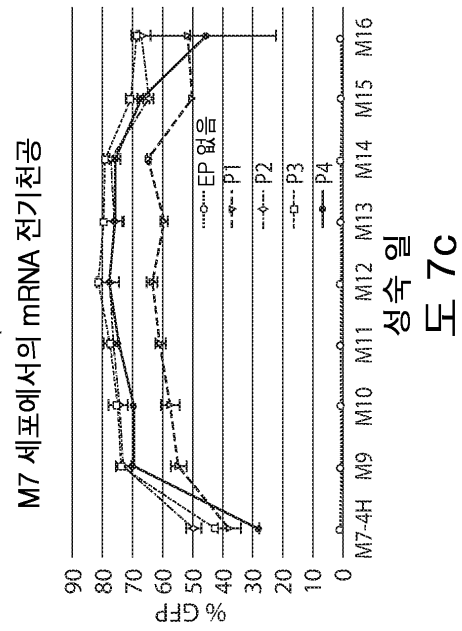
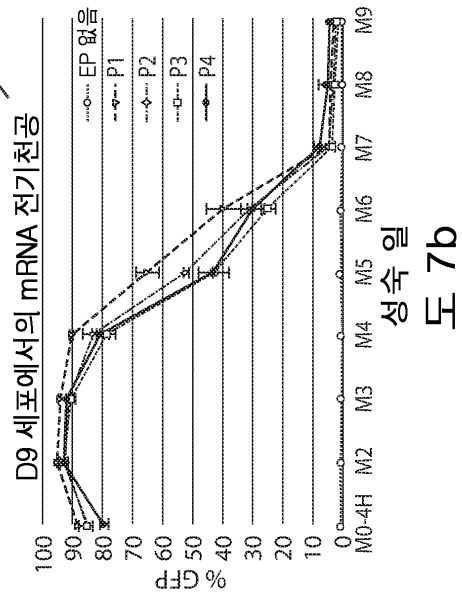
세포수

도면7

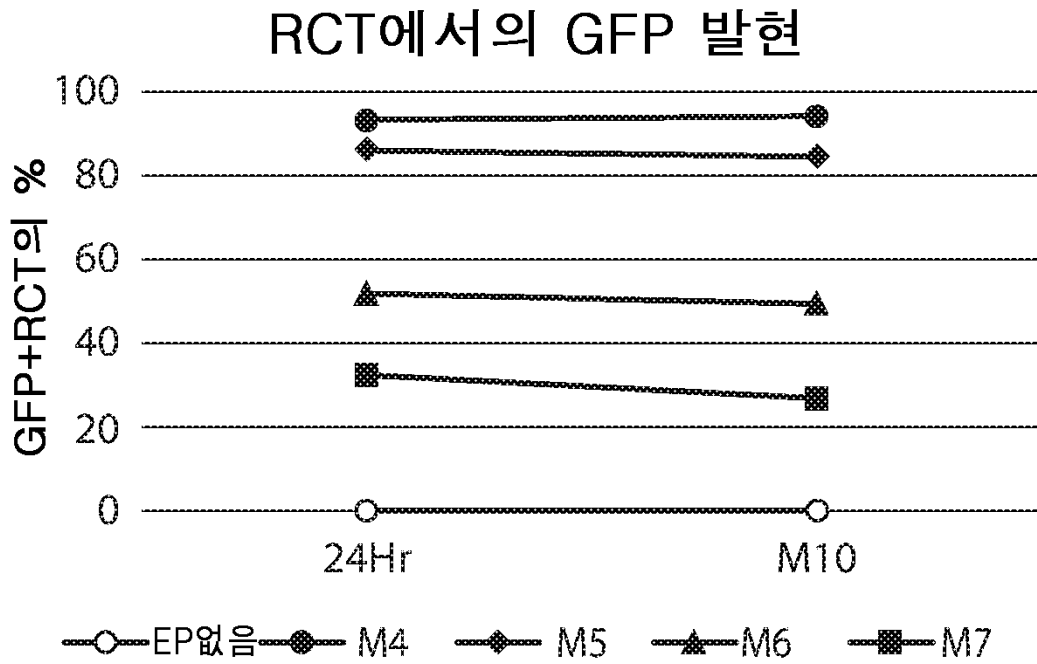
일 : 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

확장										분화										성숙												
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

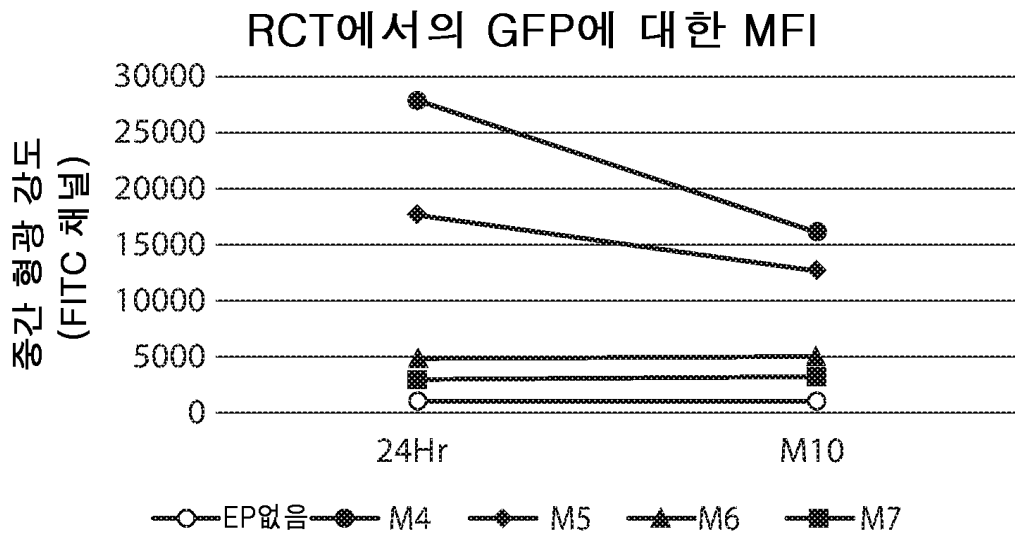
도 7a



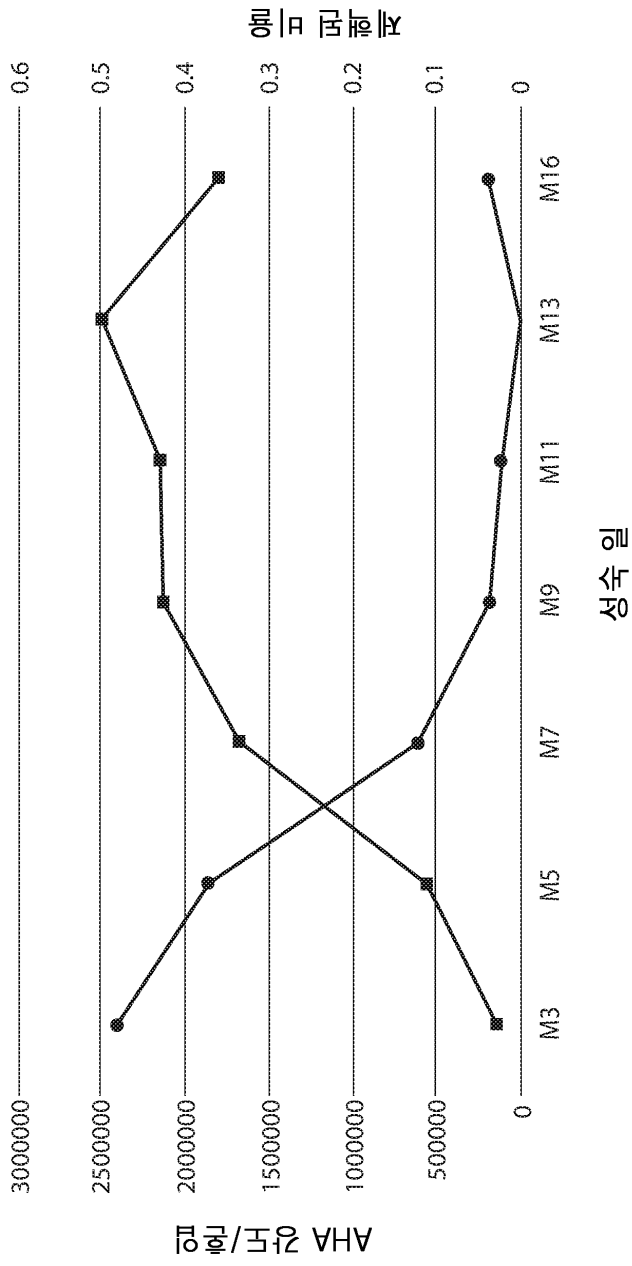
도면8a



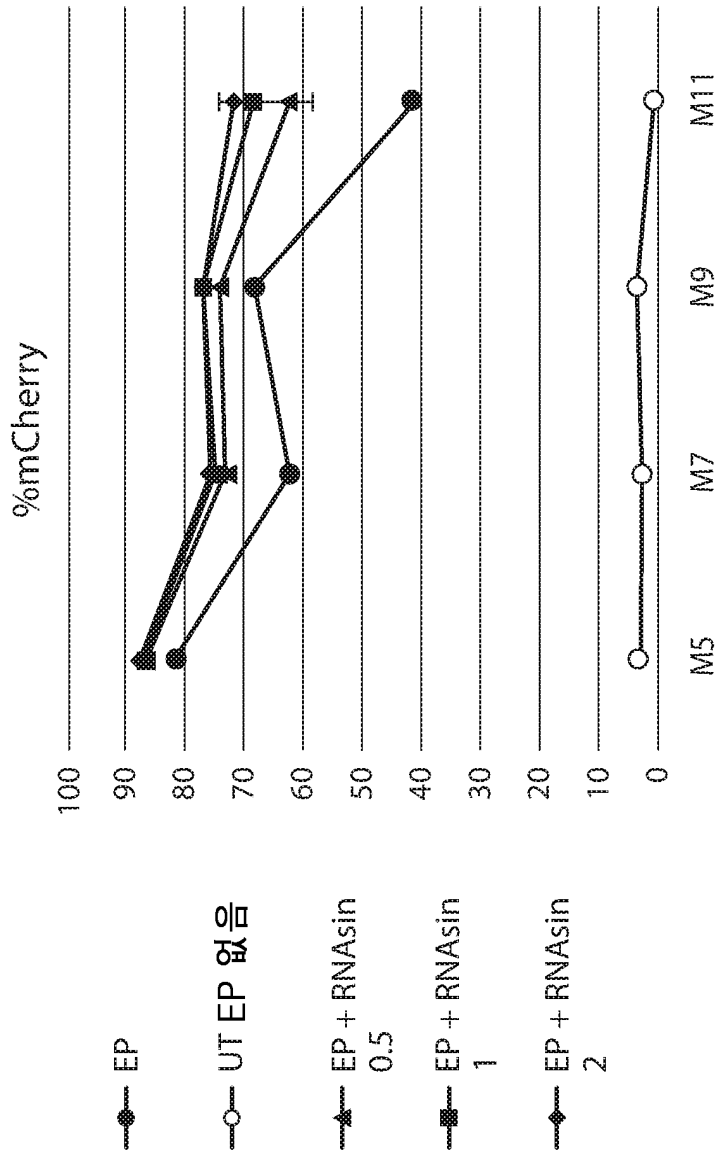
도면8b



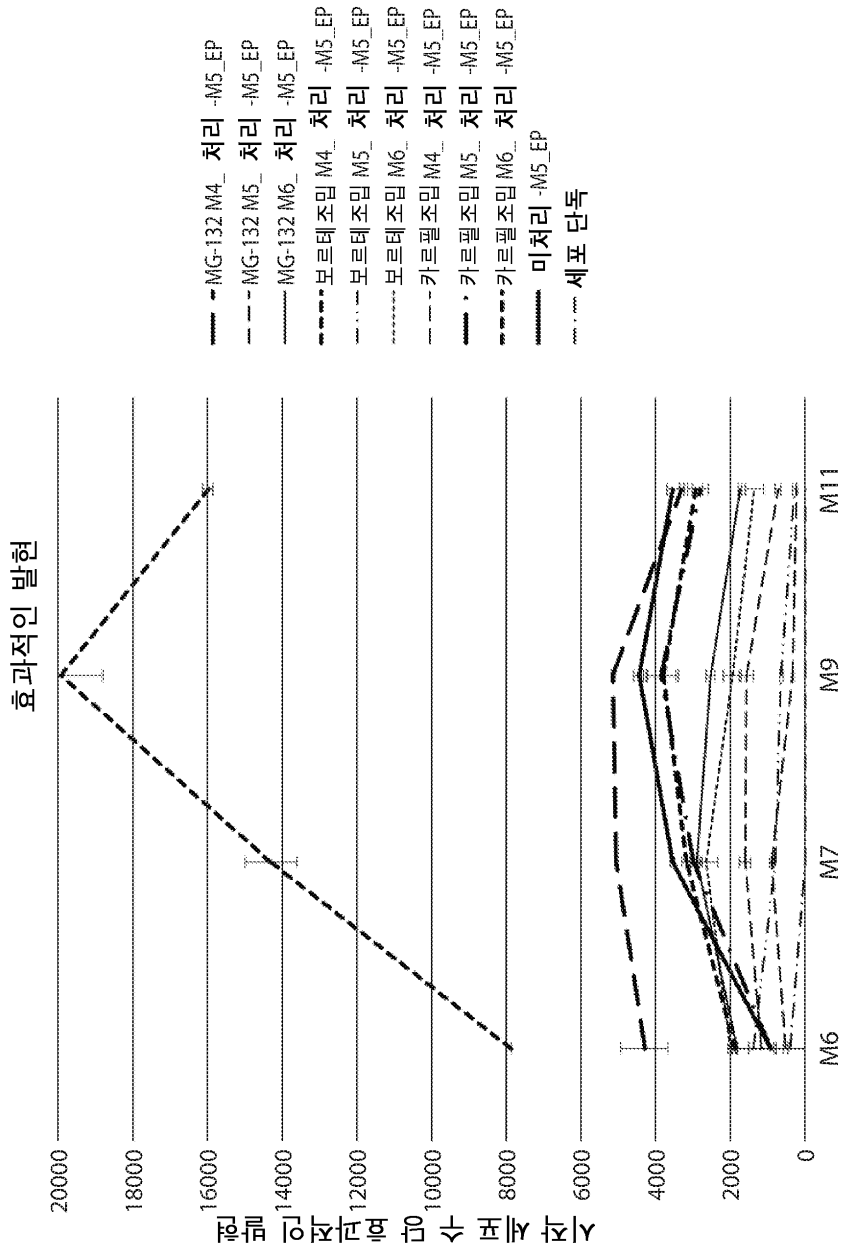
도면9



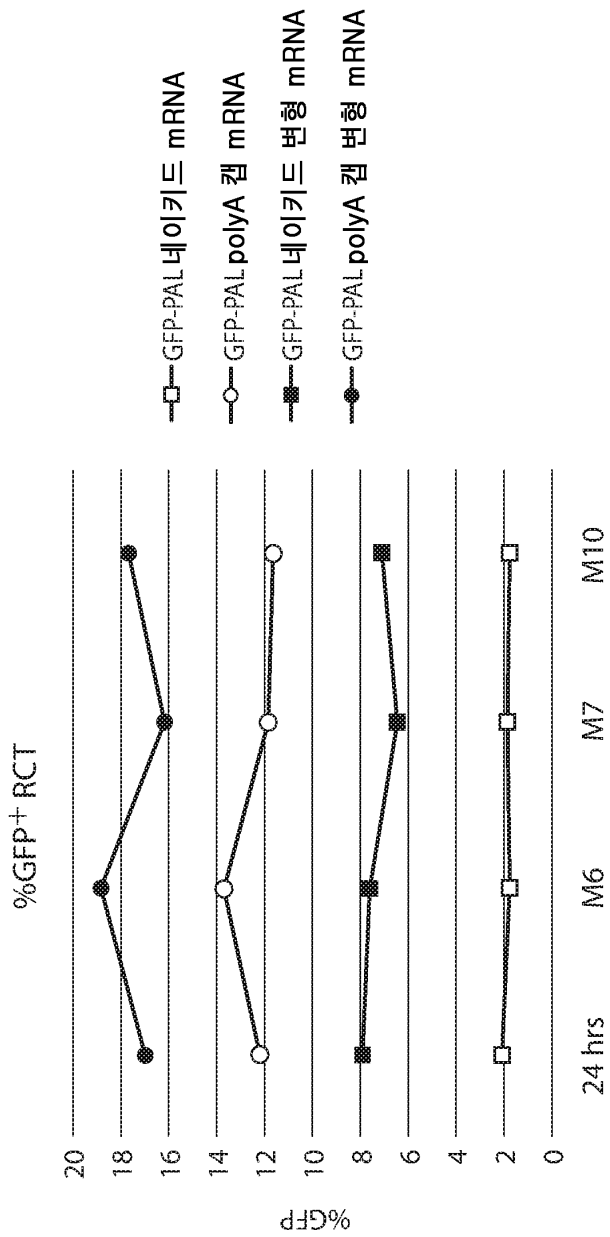
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> RUBIUS THERAPEUTICS, INC.
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS RELATED TO THERAPEUTIC CELL SYSTEMS EXPRESSING EXOGENOUS RNA
- <130> 2018FPI-12-005/US
- <150> US 62/359,416
- <151> 2016-07-07
- <150> PCT/US 2017/041155
- <151> 2017-07-07
- <160> 2

<170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 132
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> /note="Description of Unknown: hemoglobin UTR sequence"
 <400> 1
 gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttcctaa gtccaactac 60

 taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcctaata aaaaaacatt 120
 tattttcatt gc 132
 <210> 2
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 gaccgggcat tgccccagt ctccccaaa ttgggcatt gtccccgggt ctccaacgg 60
 actgggcggt gctccccgac actgaggact ggccccgggg tctcgctcac cttcagcag 119